

TENT COOPERATION TRE

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION
(PCT Rule 61.2)

Date of mailing: 03 August 2000 (03.08.00)	To: Assistant Commissioner for Patents United States Patent and Trademark Office Box PCT Washington, D.C.20231 ETATS-UNIS D'AMERIQUE in its capacity as elected Office
International application No.: PCT/EP00/00602	Applicant's or agent's file reference: 5181/OA/WO-Im
International filing date: 27 January 2000 (27.01.00)	Priority date: 29 January 1999 (29.01.99)
Applicant: KARL, Johann et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:

25 May 2000 (25.05.00)

in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election was

was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer: J. Zahra Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---

DAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Str. 116
68305 Mannheim

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM

Identification reference given by the DEPOSITOR:
MAK<proBNP>M 10.1.11

Accession number given by the
INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY:
DSM ACC2386

II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION

The microorganism identified under I. above was accompanied by:

a scientific description
 a proposed taxonomic designation

(Mark with a cross where applicable).

III. RECEIPT AND ACCEPTANCE

This International Depository Authority accepts the microorganism identified under I. above, which was received by it on 1999-01-26
(Date of the original deposit)¹.

IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION

The microorganism identified under I above was received by this International Depository Authority on (date of original deposit)
and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on (date of receipt of request
for conversion).

V. INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY

Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON
MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH
Address: Mascheroder Weg 1b
D-38124 Braunschweig

Signature(s) of person(s) having the power to represent the
International Depository Authority or of authorized official(s):

U. Weis

Date: 1999-02-11

¹ Where Rule 6.4 (d) applies, such date is the date on which the status of international depositary authority was acquired.

VIENNA DAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Str. 116

68305 Mannheim

VIABILITY STATEMENT

issued pursuant to Rule 10.2 by the
INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. DEPOSITOR		II. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM
<p>Name: Roche Diagnostics GmbH Sandhofer Str. 116 Address: 68305 Mannheim</p>		<p>Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY: DSM ACC2386</p> <p>Date of the deposit or the transfer¹: 1999-01-26</p>
III. VIABILITY STATEMENT		
<p>The viability of the microorganism identified under II above was tested on 1999-01-27². On that date, the said microorganism was</p> <p><input checked="" type="checkbox"/>³ viable</p> <p><input type="checkbox"/>³ no longer viable</p>		
IV. CONDITIONS UNDER WHICH THE VIABILITY TEST HAS BEEN PERFORMED ⁴		
V. INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY		
<p>Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Address: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig</p>		<p>Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depository Authority or of authorized official(s):</p> <p><i>U. Weis</i></p> <p>Date: 1999-02-11</p>

¹ Indicate the date of original deposit or, where a new deposit or a transfer has been made, the most recent relevant date (date of the new deposit or date of the transfer).

² In the cases referred to in Rule 10.2(a) (ii) and (iii), refer to the most recent viability test.

³ Mark with a cross the applicable box.

⁴ Fill in if the information has been requested and if the results of the test were negative.

BUSETPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Str. 116
68305 Mannheim

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM

Identification reference given by the DEPOSITOR:
MAK<proBNP>M 13.4.14

Accession number given by the
INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY:
DSM ACC2387

II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION

The microorganism identified under I. above was accompanied by:

a scientific description
 a proposed taxonomic designation

(Mark with a cross where applicable).

III. RECEIPT AND ACCEPTANCE

This International Depository Authority accepts the microorganism identified under I. above, which was received by it on 1999-01-26
(Date of the original deposit)¹.

IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION

The microorganism identified under I. above was received by this International Depository Authority on (date of original deposit)
and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on (date of receipt of request
for conversion).

V. INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY

Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON
MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH
Address: Mascheroder Weg 1b
D-38124 Braunschweig

Signature(s) of person(s) having the power to represent the
International Depository Authority or of authorized official(s):

U. Weiß

Date: 1999-02-11

¹ Where Rule 6.4 (d) applies, such date is the date on which the status of international depositary authority was acquired.

BUJAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Str. 116

68305 Mannheim

VIABILITY STATEMENT

issued pursuant to Rule 10.2 by the
INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. DEPOSITOR	II. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM
Name: Roche Diagnostics GmbH Sandhofer Str. 116 Address: 68305 Mannheim	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY: DSM ACC2387 Date of the deposit or the transfer: 1999-01-26
III. VIABILITY STATEMENT	
The viability of the microorganism identified under II above was tested on 1999-01-27. On that date, the said microorganism was <input checked="" type="checkbox"/> ³ viable <input type="checkbox"/> ⁴ no longer viable	
IV. CONDITIONS UNDER WHICH THE VIABILITY TEST HAS BEEN PERFORMED ⁴	
V. INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Address: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depository Authority or of authorized official(s):  Date: 1999-02-11

¹ Indicate the date of original deposit or, where a new deposit or a transfer has been made, the most recent relevant date (date of the new deposit or date of the transfer).

² In the cases referred to in Rule 10.2(a) (ii) and (iii), refer to the most recent viability test.

³ Mark with a cross the applicable box.

⁴ Fill in if the information has been requested and if the results of the test were negative.

**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESEN**

() EPA ✓

Absender: ANMELDEAMT

PCT

An

ROCHE DIAGNOSTICS GMBH

- Patentabteilung -

D-68298 Mannheim

ALLEMAGNE

K	Roche Diagnostics GmbH				Ab
Jg	Patentabteilung				Hil
Si	28. Feb. 2000				Wu
Kn	Et				Ra
P	Kö	Kil	S	Sz	Wb

**MITTEILUNG DES INTERNATIONALEN
AKTENZEICHENS UND DES
INTERNATIONALEN ANMELDEDATUMS**

(Regel 20.5.c) PCT)

23. 02. 2000

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts

5181/0A/WO-Im

WICHTIGE MITTEILUNG

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 00/00602

Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)
27/01/2000

Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr)
29/01/1999

Anmelder

ROCHE DIAGNOSTICS GMBH

Bezeichnung der Erfindung

1. Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß der internationalen Anmeldung das oben genannte internationale Aktenzeichen und internationale Anmeldedatum zugesprochen worden ist.
2. Weiterhin wird dem Anmelder mitgeteilt, daß das Aktenexemplar der internationalen Anmeldung dem Internationalen Büro am oben angegebenen Absendedatum übermittelt worden ist.
3. Sonstiges:

Bitte beachten Sie, da JP benannt wurde, dass es notwendig ist, die Seiten, die sich auf die Hinterlegung biologischen Materials beziehen, in die Beschreibung miteinzubeziehen, da hier, aber nicht in der Beschreibung, die Eingangsnummern den Hinterlegungen zugeordnet wurden.

Dadurch erhöht sich die Anzahl der Seiten insgesamt um 4 Seiten; demzufolge wird ein Betrag in Höhe von EUR 36* von Ihrem Konto bei der Abt. Kasse und Rechnungswesen in München abgebucht werden, in Übereinstimmung mit dem von Ihnen gegebenen Zahlungsauftrag.

*NB: Verringert um EUR 9,-- wegen der Überzahlung der int. Gebühr von EUR 413,--
+ EUR 50,--

* Das Internationale Büro überwacht die Übermittlung des Aktenexemplars durch das Anmeldeamt und unterrichtet den Anmelder über dessen Eingang (mit Formblatt PCT/IB/301). Ist das Aktenexemplar bei Ablauf des vierzehnten Monats nach dem Prioritätsdatum noch nicht eingegangen, teilt das Internationale Büro dies dem Anmelder mit (Regel 22.1.c)).

Name und Postanschrift des Anmeldeamts



Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

R.L.R. PETHER

ANTRAG AUF INTERNATIONALE VORLÄUFIGE PRÜFUNG

nach Artikel 31 des Vertrags über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens:
 Der (die) Unterzeichnete(n) beantragt (beantragen), daß für die nachstehend bezeichnete internationale Anmeldung
 die internationale vorläufige Prüfung nach dem Vertrag über die internationale Zusammenarbeit auf dem
 Gebiet des Patentwesens durchgeführt wird und benennt hiermit als ausgewählte Staaten
 alle auswählbaren Staaten (soweit nichts anderes angegeben).

Von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde auszufüllen

Bezeichnung der IPEA		Eingangsdatum des ANTRAGS
Feld Nr. I KENNZEICHNUNG DER INTERNATIONALEN ANMELDUNG		Aktenzeichen des Anmelders oder des Anwalts 5181/0A/WO-Im
Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/00602	Internationales Anmeldedatum 27. Januar 2000 (27.01.2000)	(Frühester) Prioritätstag 29. Januar 1999 (29.01.1999)
Bezeichnung der Erfindung Verfahren zum Nachweis von N-terminalem proBNP		
Feld Nr. II ANMELDER		
Name und Anschrift: Roche Diagnostics GmbH D-68298 Mannheim DEUTSCHLAND		Telefonnr.: 0621/759-3215
		Telefaxnr.: 0621/759-4457
Staatsangehörigkeit (Staat) DE	Sitz oder Wohnsitz (Staat): DE	
Name und Anschrift: KARL, Johann Bert-Schratzlseer-Strasse 7		
D-82380 Peissenberg DE		
Staatsangehörigkeit (Staat) DE	Sitz oder Wohnsitz (Staat): DE	
Name und Anschrift: LILL, Helmut Blumenstrasse 15a		
D-82407 Wielenbach DE		
Staatsangehörigkeit (Staat) DE	Sitz oder Wohnsitz (Staat): DE	
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Anmelder sind auf einem Fortsetzungsblatt angegeben.		

Fortsetzung von Feld Nr. II ANMELDER

Name und Anschrift:

STAHL, Peter
Hirtenstrasse 12

D-82347 Bernried
DE

Staatsangehörigkeit (Staat)
DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):
DE

Name und Anschrift:

KRUEGER, Kerstin
Waldeslust 4

D-81377 Muenchen
DE

Staatsangehörigkeit (Staat)
DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):
DE

Name und Anschrift:

BORGYA, Anneliese
Tannenstrasse 1

D-82402 Seeshaupt
DE

Staatsangehörigkeit (Staat)

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

Name und Anschrift:

GALLUSSER, Andreas
Am Ferchenholz 10

D-82377 Penzberg
DE

Staatsangehörigkeit (Staat)
CH

Sitz oder Wohnsitz (Staat):
DE

Weitere Anmelder sind auf einem Fortsetzungsblatt angegeben

Feld Nr. III ANWALT ODER GEMEINSAMER VERTRETER; ODER ZUSTELLANSCHRIFT

Die folgende Person ist Anwalt gemeinsamer Vertreter
 und ist vom (von den) Anmelder(n) bereits früher bestellt worden und vertritt ihn (sie) auch für die internationale vorläufige Prüfung
 wird hiermit bestellt; eine etwaige frühere Bestellung eines Anwalts/gemeinsamen Vertreters wird hiermit widerrufen.
 wird hiermit zusätzlich zu dem bereits bestellten Anwalt/gemeinsamen Vertreter, nur für das Verfahren vor der mit der internationalen Prüfung beauftragten Behörde bestellt.

Name und Anschrift:	Telefonnr.: 0621/759-3215
Roche Diagnostics GmbH - Patentabteilung - D-68298 Mannheim	Telefaxnr.: 0621/759-4457

Zustellanschrift: Dieses Kästchen ist anzukreuzen, wenn kein Anwalt oder gemeinsamer Vertreter bestellt ist und statt dessen im obigen Feld eine spezielle Zustellanschrift angegeben wird.

Feld Nr. IV GRUNDLAGE DER INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN PRÜFUNG

Erklärung betreffend Änderungen: *

1. Der Anmelder wünscht, daß die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage

der internationalen Anmeldung in der ursprünglich eingereichten Fassung

der Beschreibung in der ursprünglich eingereichten Fassung
 unter Berücksichtigung der Änderungen nach Artikel 34

der Patentansprüche in der ursprünglich eingereichten Fassung
 unter Berücksichtigung der Änderungen nach Artikel 19 (ggf. zusammen mit Begleitschreiben)
 unter Berücksichtigung der Änderungen nach Artikel 34

der Zeichnungen in der ursprünglich eingereichten Fassung
 unter Berücksichtigung der Änderungen nach Artikel 34

aufgenommen wird.

2. Der Anmelder wünscht, daß jegliche nach Artikel 19 eingereichte Änderung der Ansprüche als überholt angesehen wird.

3. Der Anmelder wünscht, daß der Beginn der internationalen vorläufigen Prüfung bis zum Ablauf von 20 Monaten ab dem Prioritätsdatum aufgeschoben wird, sofern die mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde nicht eine Kopie nach Artikel 19 vorgenommener Änderungen oder eine Erklärung des Anmelders erhält, daß er keine solchen Änderungen vornehmen will (Regel 69.1 Absatz d).

* Wenn kein Kästchen angekreuzt wird, wird mit der internationalen vorläufigen Prüfung auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der ursprünglich eingereichten Fassung begonnen; wenn eine Kopie der Änderungen der Ansprüche nach Artikel 19 und/oder Änderungen der internationalen Anmeldung nach Artikel 34 bei der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde eingeht, bevor diese mit der Erstellung eines schriftlichen Bescheids oder des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts begonnen hat, wird jedoch die geänderte Fassung verwendet.

Sprache für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung: deutsch

dies ist die Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht wurde.
 dies ist die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht wurde
 dies ist die Sprache der Veröffentlichung der internationalen Anmeldung
 dies ist die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht wurde/wird.

Feld Nr. V BENENNUNG VON STAATEN ALS AUSGEWÄHLTE STAATEN

Der Anmelder benennt hiermit als ausgewählte Staaten alle auswählbaren Staaten mit Ausnahme der folgenden Staaten, die der Anmelder nicht benennen möchte:

Feld Nr. IV KONTROLLISTE

Dem Antrag liegen folgende Unterlagen für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung in der in Feld Nr. IV angegebenen Sprache bei:

1. Übersetzung der internationale Anmeldung	:	Blätter
2. Änderungen nach Artikel 34	:	Blätter
3. Kopie (oder, falls erforderlich, Übersetzung) der Änderungen nach Art.19	:	Blätter
4. Kopie (oder, falls erforderlich, Übersetzung) einer Erklärung nach Art. 19	:	Blätter
5. Begleitschreiben	:	Blätter
6. Sonstige	:	Blätter

Von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde auszufüllen

	erhalten	nicht erhalten
1. Übersetzung der internationale Anmeldung	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2. Änderungen nach Artikel 34	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3. Kopie (oder, falls erforderlich, Übersetzung) der Änderungen nach Art.19	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4. Kopie (oder, falls erforderlich, Übersetzung) einer Erklärung nach Art. 19	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
5. Begleitschreiben	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
6. Sonstige	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Dem Antrag liegen außerdem die nachstehend angekreuzten Unterlagen bei:

1. <input checked="" type="checkbox"/> Blatt für die Gebührenrechnung	4. <input type="checkbox"/> Begründung für das Fehlen einer Unterschrift
2. <input type="checkbox"/> unterzeichnete gesonderte Vollmacht	5. <input type="checkbox"/> Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz-Protokoll in computerlesbarer Form
3. <input type="checkbox"/> Kopie der allgemeinen Vollmacht; Aktenzeichen (falls vorhanden):	6. <input checked="" type="checkbox"/> Sonstige <input type="checkbox"/> Freiumschlag Empfangsbestätigung

Feld Nr. VII UNTERSCHRIFT DES ANMELDERS, ANWALTS ODER GEMEINSAMEN VERTETERS

Roche Diagnostics GmbH

Mannheim, 23.05.2000 /Ha

ppa.

i.V.

Dr. Kolb

Dr. Schwarz

Von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde auszufüllen	
1. Datum des tatsächlichen Eingangs des ANTRAGS:	
2. Geändertes Eingangsdatum des Antrags aufgrund von BERICHTIGUNGEN nach Regel 60.1 Absatz b:	
3. <input type="checkbox"/> Eingangsdatum des Antrags NACH Ablauf von 19 Monaten ab Prioritätsdatum; Punkt 4 und Punkt 5, unten, finden keine Anwendung	<input type="checkbox"/> Der Anmelder wurde entsprechend unterrichtet
4. <input type="checkbox"/> Eingangsdatum des Antrags INNERHALB 19 Monate ab Prioritätsdatum wegen Fristverlängerung nach Regel 80.5.	
5. <input type="checkbox"/> Das Eingangsdatum des Antrags liegt nach Ablauf von 19 Monaten ab Prioritätsdatum, der verspätete Eingang ist aber nach Regel 82 ENTSCHULDIGT.	

Vom Internationalen Büro auszufüllen

Antrag vom IPEA erhalten am:

**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS**

TK: Dr. Karl 23.8.00

Absender: INTERNATIONALE RECHERCHENBEHÖRDE

An

ROCHE DIAGNOSTICS GMBH
- Patentabteilung
D-68298 Mannheim
GERMANY

K	Roche Diagnostics GmbH Patentabteilung			AB
JG				HIL
SI	21. Aug. 2000			WN
Kn	Er. <i>OZ</i>			RA
P	KÖ	KIL	S	IM

**MITTEILUNG ÜBER DIE ÜBERMITTLUNG DES
INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHTS
ODER DER ERKLÄRUNG**

(Regel 44.1 PCT)

21/08/2000

Absendedatum
(Tag/Monat/Jahr)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts

5181/0A/WO-Im

WEITERES VORGEHEN

siehe Punkte 1 und 4 unten

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/00602

Internationales Anmeldedatum
(Tag/Monat/Jahr)

27/01/2000

Anmelder

ROCHE DIAGNOSTICS GMBH et al

1. Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß der internationale Recherchenbericht erstellt wurde und ihm hiermit übermittelt wird.

Einreichung von Änderungen und einer Erklärung nach Artikel 19:

Der Anmelder kann auf eigenen Wunsch die Ansprüche der internationalen Anmeldung ändern (siehe Regel 46):

Bis wann sind Änderungen einzureichen?

Die Frist zur Einreichung solcher Änderungen beträgt üblicherweise zwei Monate ab der Übermittlung des internationalen Recherchenberichts; weitere Einzelheiten sind den Anmerkungen auf dem Beiblatt zu entnehmen.

Wo sind Änderungen einzureichen?

Unmittelbar beim Internationalen Büro der WIPO, 34, CHEMIN des Colombettes, CH-1211 Genf 20,
Telefaxnr.: (41-22) 740.14.35

Nähere Hinweise sind den Anmerkungen auf dem Beiblatt zu entnehmen.

2. Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß kein internationaler Recherchenbericht erstellt wird und daß ihm hiermit die Erklärung nach Artikel 17(2a) übermittelt wird.

3. **Hinsichtlich des Widerspruchs** gegen die Entrichtung einer zusätzlichen Gebühr (zusätzlicher Gebühren) nach Regel 40.2 wird dem Anmelder mitgeteilt, daß

der Widerspruch und die Entscheidung hierüber zusammen mit seinem Antrag auf Übermittlung des Wortlauts sowohl des Widerspruchs als auch der Entscheidung hierüber an die Bestimmungämter dem Internationalen Büro übermittelt werden sind.

noch keine Entscheidung über den Widerspruch vorliegt; der Anmelder wird benachrichtigt, sobald eine Entscheidung getroffen wurde.

4. **Weiteres Vorgehen:** Der Anmelder wird auf folgendes aufmerksam gemacht:

Kurz nach Ablauf von 18 Monaten seit dem Prioritätsdatum wird die internationale Anmeldung vom Internationalen Büro veröffentlicht. Will der Anmelder die Veröffentlichung verhindern oder auf einen späteren Zeitpunkt verschieben, so muß gemäß Regel 90 bis bzw. 90^{bis} 3 vor Abschluß der technischen Vorbereitungen für die internationale Veröffentlichung eine Erklärung über die Zurücknahme der internationalen Anmeldung oder des Prioritätsanspruchs beim Internationalen Büro eingehen.

Innerhalb von 19 Monaten seit dem Prioritätsdatum ist ein Antrag auf internationale vorläufige Prüfung einzureichen, wenn der Anmelder den Eintritt in die nationale Phase bis zu 30 Monaten seit dem Prioritätsdatum (in manchen Ämtern sogar noch länger) verschieben möchte.

Innerhalb von 20 Monaten seit dem Prioritätsdatum muß der Anmelder die für den Eintritt in die nationale Phase vorgeschriebenen Handlungen vor allen Bestimmungämtern vornehmen, die nicht innerhalb von 19 Monaten seit dem Prioritätsdatum in der Anmeldung oder einer nachträglichen Auswahlserklärung ausgewählt wurden oder nicht ausgewählt werden konnten, da für sie Kapitel II des Vertrages nicht verbindlich ist.

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter
Jaap Hurenkamp

ANMERKUNGEN ZU FORMBLATT PCT/ISA/220

Diese Anmerkungen sollen grundlegende Hinweise zur Einreichung von Änderungen gemäß Artikel 19 geben. Diesen Anmerkungen liegen die Erfordernisse des Vertrags über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens (PCT), der Ausführungsordnung und der Verwaltungsrichtlinien zu diesem Vertrag zugrunde. Bei Abweichungen zwischen diesen Anmerkungen und obengenannten Texten sind letztere maßgebend. Nähere Einzelheiten sind dem PCT-Leitfaden für Anmelder, einer Veröffentlichung der WIPO, zu entnehmen. Die in diesen Anmerkungen verwendeten Begriffe "Artikel", "Regel" und "Abschnitt" beziehen sich jeweils auf die Bestimmungen des PCT-Vertrags, der PCT-Ausführungsordnung bzw. der PCT-Verwaltungsrichtlinien.

HINWEISE ZU ÄNDERUNGEN GEMÄSS ARTIKEL 19

Nach Erhalt des internationalen Recherchenberichts hat der Anmelder die Möglichkeit, einmal die Ansprüche der internationalen Anmeldung zu ändern. Es ist jedoch zu betonen, daß, da alle Teile der internationalen Anmeldung (Ansprüche, Beschreibung und Zeichnungen) während des internationalen vorläufigen Prüfungsverfahrens geändert werden können, normalerweise keine Notwendigkeit besteht, Änderungen der Ansprüche nach Artikel 19 einzureichen, außer wenn der Anmelder z.B. zum Zwecke eines vorläufigen Schutzes die Veröffentlichung dieser Ansprüche wünscht oder ein anderer Grund für eine Änderung der Ansprüche vor ihrer internationalen Veröffentlichung vorliegt. Weiterhin ist zu beachten, daß ein vorläufiger Schutz nur in einigen Staaten erhältlich ist.

Welche Teile der internationalen Anmeldung können geändert werden?

Im Rahmen von Artikel 19 können nur die Ansprüche geändert werden.

In der internationalen Phase können die Ansprüche auch nach Artikel 34 vor der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde geändert (oder nochmals geändert) werden. Die Beschreibung und die Zeichnungen können nur nach Artikel 34 vor der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde geändert werden.

Beim Eintritt in die nationale Phase können alle Teile der internationalen Anmeldung nach Artikel 28 oder gegebenenfalls Artikel 41 geändert werden.

Bis wann sind Änderungen einzureichen?

Innerhalb von zwei Monaten ab der Übermittlung des internationalen Recherchenberichts oder innerhalb von sechzehn Monaten ab dem Prioritätsdatum, je nachdem, welche Frist später abläuft. Die Änderungen gelten jedoch als rechtzeitig eingereicht, wenn sie dem Internationalen Büro nach Ablauf der maßgebenden Frist, aber noch vor Abschluß der technischen Vorbereitungen für die internationale Veröffentlichung (Regel 46.1) zugehen.

Wo sind die Änderungen nicht einzureichen?

Die Änderungen können nur beim Internationalen Büro, nicht aber beim Anmeldeamt oder der internationalen Recherchenbehörde eingereicht werden (Regel 46.2).

Falls ein Antrag auf internationale vorläufige Prüfung eingereicht wurde/wird, siehe unten.

In welcher Form können Änderungen erfolgen?

Eine Änderung kann erfolgen durch Streichung eines oder mehrerer ganzer Ansprüche, durch Hinzufügung eines oder mehrerer neuer Ansprüche oder durch Änderung des Wortlauts eines oder mehrerer Ansprüche in der eingereichten Fassung.

Für jedes Anspruchsblatt, das sich aufgrund einer oder mehrerer Änderungen von dem ursprünglich eingereichten Blatt unterscheidet, ist ein Ersatzblatt einzureichen.

Alle Ansprüche, die auf einem Ersatzblatt erscheinen, sind mit arabischen Ziffern zu numerieren. Wird ein Anspruch gestrichen, so brauchen die anderen Ansprüche nicht neu numeriert zu werden. Im Fall einer Neunumerierung sind die Ansprüche fortlaufend zu numerieren (Verwaltungsrichtlinien, Abschnitt 205 b)).

Die Änderungen sind in der Sprache abzufassen, in der die internationale Anmeldung veröffentlicht wird.

Welche Unterlagen sind den Änderungen beizufügen?

Begleitschreiben (Abschnitt 205 b)):

Die Änderungen sind mit einem Begleitschreiben einzureichen.

Das Begleitschreiben wird nicht zusammen mit der internationalen Anmeldung und den geänderten Ansprüchen veröffentlicht. Es ist nicht zu verwechseln mit der "Erklärung nach Artikel 19(1)" (siehe unten, "Erklärung nach Artikel 19 (1)").

Das Begleitschreiben ist nach Wahl des Anmelders in englischer oder französischer Sprache abzufassen. Bei englischsprachigen internationalen Anmeldungen ist das Begleitschreiben aber ebenfalls in englischer, bei französischsprachigen internationalen Anmeldungen in französischer Sprache abzufassen.

ANMERKUNGEN ZU FORMBLATT PCT/ISA/220 (Fortsetzung)

Im Begleitschreiben sind die Unterschiede zwischen den Ansprüchen in der eingereichten Fassung und den geänderten Ansprüchen anzugeben. So ist insbesondere zu jedem Anspruch in der internationalen Anmeldung anzugeben (gleichlautende Angaben zu verschiedenen Ansprüchen können zusammengefaßt werden), ob

- i) der Anspruch unverändert ist;
- ii) der Anspruch gestrichen worden ist;
- iii) der Anspruch neu ist;
- iv) der Anspruch einen oder mehrere Ansprüche in der eingereichten Fassung ersetzt;
- v) der Anspruch auf die Teilung eines Anspruchs in der eingereichten Fassung zurückzuführen ist.

Im folgenden sind Beispiele angegeben, wie Änderungen im Begleitschreiben zu erläutern sind:

1. [Wenn anstelle von ursprünglich 48 Ansprüchen nach der Änderung einiger Ansprüche 51 Ansprüche existieren]: "Die Ansprüche 1 bis 29, 31, 32, 34, 35, 37 bis 48 werden durch geänderte Ansprüche gleicher Numerierung ersetzt; Ansprüche 30, 33 und 36 unverändert; neue Ansprüche 49 bis 51 hinzugefügt."
2. [Wenn anstelle von ursprünglich 15 Ansprüchen nach der Änderung aller Ansprüche 11 Ansprüche existieren]: "Geänderte Ansprüche 1 bis 11 treten an die Stelle der Ansprüche 1 bis 15."
3. [Wenn ursprünglich 14 Ansprüche existierten und die Änderungen darin bestehen, daß einige Ansprüche gestrichen werden und neue Ansprüche hinzugefügt werden]: "Ansprüche 1 bis 6 und 14 unverändert; Ansprüche 7 bis 13 gestrichen; neue Ansprüche 15, 16 und 17 hinzugefügt." Oder "Ansprüche 7 bis 13 gestrichen; neue Ansprüche 15, 16 und 17 hinzugefügt; alle übrigen Ansprüche unverändert."
4. [Wenn verschiedene Arten von Änderungen durchgeführt werden]: "Ansprüche 1-10 unverändert; Ansprüche 11 bis 13, 18 und 19 gestrichen; Ansprüche 14, 15 und 16 durch geänderten Anspruch 14 ersetzt; Anspruch 17 in geänderte Ansprüche 15, 16 und 17 unterteilt; neue Ansprüche 20 und 21 hinzugefügt."

"Erklärung nach Artikel 19(1)" (Regel 46.4)

Den Änderungen kann eine Erklärung beigefügt werden, mit der die Änderungen erläutert und ihre Auswirkungen auf die Beschreibung und die Zeichnungen dargelegt werden (die nicht nach Artikel 19 (1) geändert werden können).

Die Erklärung wird zusammen mit der internationalen Anmeldung und den geänderten Ansprüchen veröffentlicht.

Sie ist in der Sprache abzufassen, in der die internationale Anmeldung veröffentlicht wird.

Sie muß kurz gehalten sein und darf, wenn in englischer Sprache abgefaßt oder ins Englische übersetzt, nicht mehr als 500 Wörter umfassen.

Die Erklärung ist nicht zu verwechseln mit dem Begleitschreiben, das auf die Unterschiede zwischen den Ansprüchen in der eingereichten Fassung und den geänderten Ansprüchen hinweist, und ersetzt letzteres nicht. Sie ist auf einem gesonderten Blatt einzureichen und in der Überschrift als solche zu kennzeichnen, vorzugsweise mit den Worten "Erklärung nach Artikel 19 (1)".

Die Erklärung darf keine herabsetzenden Äußerungen über den internationalen Recherchenbericht oder die Bedeutung von in dem Bericht angeführten Veröffentlichungen enthalten. Sie darf auf im internationalen Recherchenbericht angeführte Veröffentlichungen, die sich auf einen bestimmten Anspruch beziehen, nur im Zusammenhang mit einer Änderung dieses Anspruchs Bezug nehmen.

Auswirkungen eines bereits gestellten Antrags auf internationale vorläufige Prüfung

Ist zum Zeitpunkt der Einreichung von Änderungen nach Artikel 19 bereits ein Antrag auf internationale vorläufige Prüfung gestellt worden, so sollte der Anmelder in seinem Interesse gleichzeitig mit der Einreichung der Änderungen beim Internationalen Büro auch eine Kopie der Änderungen bei der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde einreichen (siehe Regel 62.2 a), erster Satz).

Auswirkungen von Änderungen hinsichtlich der Übersetzung der internationalen Anmeldung beim Eintritt in die nationale Phase

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß bei Eintritt in die nationale Phase möglicherweise anstatt oder zusätzlich zu der Übersetzung der Ansprüche in der eingereichten Fassung eine Übersetzung der nach Artikel 19 geänderten Ansprüche an die bestimmten/ausgewählten Ämter zu übermitteln ist.

Nähere Einzelheiten über die Erfordernisse jedes bestimmten/ausgewählten Amtes sind Band II des PCT-Leitfadens für Anmelder zu entnehmen.

ANTRAG

Der Unterzeichnete beantragt, daß die vorliegende internationale Anmeldung nach dem Vertrag über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens behandelt wird.

Vom Anmeldeamt auszufüllen	
PCT/EP 00/00602	
Internationales Aktenzeichen	
27 JAN 2000 (27.01.2000)	
Internationales Anmeldedatum	
EUROPEAN PATENT OFFICE	
PCT INTERNATIONAL APPLICATION	
Name des Anmeldeamts und "PCT International Application"	
Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts (falls gewünscht) (max. 12 Zeichen) 5181/0A/WO-Im	

Feld Nr. I BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG

Verfahren zum Nachweis von N-terminalem proBNP

Feld Nr. II ANMELDER

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

Roche Diagnostics GmbH

D-68298 Mannheim

DE

Diese Person ist gleichzeitig Erfinder

Telefonnr.:

0621/759-4337

Telefaxnr.:

0621/759-4457

Fernschreibnr.:

Staatsangehörigkeit (Staat):

DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

alle Bestimmungsstaaten

alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

nur die Vereinigten Staaten von Amerika

die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

KARL, Johann

Bert-Schratzlseer-Strasse 7

D-82380 Peissenberg

DE

Diese Person ist:

nur Anmelder

Anmelder und Erfinder

nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

alle Bestimmungsstaaten

alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

nur die Vereinigten Staaten von Amerika

die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem Fortsetzungsblatt angegeben.

Feld Nr. IV ANWALT ODER GEMEINSAMER VERTRETER; ZUSTELLANSCHRIFT

Die folgende Person wird hiermit bestellt/ist bestellt worden, um für den (die) Anmelder vor den zuständigen internationalen Behörden in folgender Eigenschaft zu handeln als:

Anwalt gemeinsamer Vertreter

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)

Roche Diagnostics GmbH

- Patentabteilung -

D-68298 Mannheim

DE

Telefonnr.:

0621/759-4337

Telefaxnr.:

0621/759-4457

Fernschreibnr.:

Zustellanschrift: Dieses Kästchen ist anzukreuzen, wenn kein Anwalt oder gemeinsamer Vertreter bestellt ist und statt dessen im obigen Feld eine spezielle Zustellanschrift angegeben ist.

Fortsetzung von Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER

Wird keines der folgenden Felder benutzt, so sollte dieses Blatt dem Antrag nicht beigefügt werden.

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

LILL, Helmut
Blumenstrasse 15a

D-82407 Wielenbach
DE

Diese Person ist:

 nur Anmelder Anmelder und Erfinder nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat): DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat): DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

 alle Bestimmungsstaaten alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika nur die Vereinigten Staaten von Amerika die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

STAHL, Peter
Hirtenstrasse 12

D-82347 Bernried
DE

Diese Person ist:

 nur Anmelder Anmelder und Erfinder nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat): DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat): DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

 alle Bestimmungsstaaten alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika nur die Vereinigten Staaten von Amerika die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

KRUEGER, Kerstin
Waldeslust 4

D-81377 Muenchen
DE

Diese Person ist:

 nur Anmelder Anmelder und Erfinder nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat): DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat): DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

 alle Bestimmungsstaaten alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika nur die Vereinigten Staaten von Amerika die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

BORGYA, Anneliese
Beiselestrasse 18

neue Adr. Tanner Str 4

82402 Seeon

D-82327 Tutzing
DE

Diese Person ist:

 nur Anmelder Anmelder und Erfinder nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat): DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat): DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

 alle Bestimmungsstaaten alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika nur die Vereinigten Staaten von Amerika die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem zusätzlichen Fortsetzungsblatt angegeben.

Fortsetzung von Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER

Wird keines der folgenden Felder benutzt, so sollte dieses Blatt dem Antrag nicht beigefügt werden.

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

GALLUSSER, Andreas
Am Ferchenholz 10

D-82377 Penzberg
DE

Diese Person ist:

 nur Anmelder Anmelder und Erfinder nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat): CH

Sitz oder Wohnsitz (Staat): DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

 alle Bestimmungsstaaten alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika nur die Vereinigten Staaten von Amerika die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

Diese Person ist:

 nur Anmelder Anmelder und Erfinder nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

 alle Bestimmungsstaaten alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika nur die Vereinigten Staaten von Amerika die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

Diese Person ist:

 nur Anmelder Anmelder und Erfinder nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

 alle Bestimmungsstaaten alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika nur die Vereinigten Staaten von Amerika die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

Diese Person ist:

 nur Anmelder Anmelder und Erfinder nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

 alle Bestimmungsstaaten alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika nur die Vereinigten Staaten von Amerika die im Zusatzfeld angegebenen Staaten Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem zusätzlichen Fortsetzungsblatt angegeben.

Feld Nr. V BESTIMMUNG STAATEN

Die folgenden Bestimmungen nach Regel 4.9 Absatz a werden hiermit vorgenommen (bitte die entsprechenden Kästchen ankreuzen; wenigstens ein Kästchen muß angekreuzt werden):

Regionales Patent

AP **ARIPO-Patent:** GH Ghana, GM Gambia, KE Kenia, LS Lesotho, MW Malawi, SD Sudan, SL Sierra Leone, SZ Swasiland, UG Uganda, ZW Simbabwe und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Harare-Protokolls und des PCT ist

EA **Eurasisches Patent:** AM Armenien, AZ Aserbaidschan, BY Belarus, KG Kirgisistan, KZ Kasachstan, MD Republik Moldau, RU Russische Föderation, TJ Tadschikistan, TM Turkmenistan und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Eurasischen Patentübereinkommens und des PCT ist

EP **Europäisches Patent:** AT Österreich, BE Belgien, CH und LI Schweiz und Liechtenstein, CY Zypern, DE Deutschland, DK Dänemark, ES Spanien, FI Finnland, FR Frankreich, GB Vereinigtes Königreich, GR Griechenland, IE Irland, IT Italien, LU Luxemburg, MC Monaco, NL Niederlande, PT Portugal, SE Schweden und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Europäischen Patentübereinkommens und des PCT ist

OA **OAPI-Patent:** BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Zentralafrikanische Republik, CG Kongo, CI Côte d'Ivoire, CM Kamerun, GA Gabun, GN Guinea, GW Guinea-Bissau, ML Mali, MR Mauretanien, NE Niger, SN Senegal, TD Tschad, TG Togo und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat der OAPI und des PCT ist (falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben)

Nationales Patent (falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben):

<input type="checkbox"/> AE Vereinigte Arabische Emirate	<input type="checkbox"/> LR Liberia
<input type="checkbox"/> AL Albanien	<input type="checkbox"/> LS Lesotho
<input type="checkbox"/> AM Armenien	<input type="checkbox"/> LT Litauen
<input type="checkbox"/> AT Österreich	<input type="checkbox"/> LU Luxemburg
<input checked="" type="checkbox"/> AU Australien	<input type="checkbox"/> LV Lettland
<input type="checkbox"/> AZ Aserbaidschan	<input type="checkbox"/> MD Republik Moldau
<input type="checkbox"/> BA Bosnien-Herzegowina	<input type="checkbox"/> MG Madagaskar
<input type="checkbox"/> BB Barbados	<input type="checkbox"/> MK Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien
<input type="checkbox"/> BG Bulgarien	<input type="checkbox"/> MN Mongolei
<input type="checkbox"/> BR Brasilien	<input type="checkbox"/> MW Malawi
<input type="checkbox"/> BY Belarus	<input checked="" type="checkbox"/> MX Mexiko
<input checked="" type="checkbox"/> CA Kanada	<input checked="" type="checkbox"/> NO Norwegen
<input type="checkbox"/> CH und LI Schweiz und Liechtenstein	<input checked="" type="checkbox"/> NZ Neuseeland
<input checked="" type="checkbox"/> CN China	<input checked="" type="checkbox"/> PL Polen
<input type="checkbox"/> CU Kuba	<input type="checkbox"/> PT Portugal
<input type="checkbox"/> CZ Tschechische Republik	<input checked="" type="checkbox"/> RO Rumänien
<input type="checkbox"/> DE Deutschland	<input type="checkbox"/> RU Russische Föderation
<input type="checkbox"/> DK Dänemark	<input type="checkbox"/> SD Sudan
<input type="checkbox"/> EE Estland	<input type="checkbox"/> SE Schweden
<input type="checkbox"/> ES Spanien	<input type="checkbox"/> SG Singapur
<input type="checkbox"/> FI Finnland	<input type="checkbox"/> SI Slowenien
<input type="checkbox"/> GB Vereinigtes Königreich	<input type="checkbox"/> SK Slowakei
<input type="checkbox"/> GD Grenada	<input type="checkbox"/> SL Sierra Leone
<input type="checkbox"/> GE Georgien	<input type="checkbox"/> TJ Tadschikistan
<input type="checkbox"/> GH Ghana	<input type="checkbox"/> TM Turkmenistan
<input type="checkbox"/> GM Gambia	<input type="checkbox"/> TR Türkei
<input type="checkbox"/> HR Kroatien	<input type="checkbox"/> TT Trinidad und Tobago
<input checked="" type="checkbox"/> HU Ungarn	<input type="checkbox"/> UA Ukraine
<input type="checkbox"/> ID Indonesien	<input type="checkbox"/> UG Uganda
<input checked="" type="checkbox"/> IL Israel	<input checked="" type="checkbox"/> US Vereinigte Staaten von Amerika
<input type="checkbox"/> IN Indien	<input type="checkbox"/> UZ Usbekistan
<input type="checkbox"/> IS Island	<input type="checkbox"/> VN Vietnam
<input checked="" type="checkbox"/> JP Japan	<input type="checkbox"/> YU Jugoslawien
<input type="checkbox"/> KE Kenia	<input checked="" type="checkbox"/> ZA Südafrika
<input type="checkbox"/> KG Kirgisistan	<input type="checkbox"/> ZW Simbabwe
<input type="checkbox"/> KP Demokratische Volksrepublik Korea	
<input checked="" type="checkbox"/> KR Republik Korea	
<input type="checkbox"/> KZ Kasachstan	
<input type="checkbox"/> LC Saint Lucia	
<input type="checkbox"/> LK Sri Lanka	

Kästchen für die Bestimmung von Staaten, die dem PCT nach der Veröffentlichung dieses Formblatts beigetreten sind:

.....

.....

Erklärung bzgl. vorsorglicher Bestimmungen: Zusätzlich zu den oben genannten Bestimmungen nimmt der Anmelder nach Regel 4.9 Absatz b auch alle anderen nach dem PCT zulässigen Bestimmungen vor mit Ausnahme der im Zusatzfeld genannten Bestimmungen, die von dieser Erklärung ausgenommen sind. Der Anmelder erklärt, daß diese zusätzlichen Bestimmungen unter dem Vorbehalt einer Bestätigung stehen und jede zusätzliche Bestimmung, die vor Ablauf von 15 Monaten ab dem Prioritätsdatum nicht bestätigt wurde, nach Ablauf dieser Frist als vom Anmelder zurückgenommen gilt. (Die Bestätigung einer Bestimmung erfolgt durch die Einreichung einer Mitteilung, in der diese Bestimmung angegeben wird, und die Zahlung der Bestimmungs- und der Bestätigungsgebühr. Die Bestätigung muß beim Anmeldeamt innerhalb der Frist von 15 Monaten eingehen.)

Feld Nr. VI PRIORITYSAUFLAUFKUCH

Weitere Prioritätsansprüche sind im Zusatzfeld angegeben.

Anmeldeatum der früheren Anmeldung (Tag/Monat/Jahr)	Aktenzeichen der früheren Anmeldung	Ist die frühere Anmeldung eine:		
		nationale Anmeldung: Staat	regionale Anmeldung: regionales Amt	internationale Anmeldung: Anmeldeamt
Zeile (1) (29. 01. 99) 29. Januar 1999	199 03 489.3	Deutschland		
Zeile (2) (12. 03. 99) 12. März 1999	199 11 044.1	Deutschland		
Zeile (3)				

Das Anmeldeamt wird ersucht, eine beglaubigte Abschrift der oben in der (den) Zeile(n) _____ bezeichneten früheren Anmeldung(en) zu erstellen und dem internationalen Büro zu übermitteln (nur falls die frühere Anmeldung(en) bei dem Amt eingereicht worden ist/sind), das für die Zwecke dieser internationalen Anmeldung Anmeldeamt ist)

* Falls es sich bei der früheren Anmeldung um eine ARIPO-Anmeldung handelt, so muß in dem Zusatzfeld mindestens ein Staat angegeben werden, der Mitgliedstaat der Pariser Verbandsübereinkunft zum Schutz des gewerblichen Eigentums ist und für den die frühere Anmeldung eingereicht wurde.

Feld Nr. VII INTERNATIONALE RECHERCHENBEHÖRDE

Wahl der internationalen Recherchenbehörde (ISA) (falls zwei oder mehr als zwei internationale Recherchenbehörde für die Ausführung der internationalen Recherche zuständig sind, geben Sie die von Ihnen gewählte Behörde an; der Zweiibuchstaben-Code kann benutzt werden):

ISA /

Antrag auf Nutzung der Ergebnisse einer früheren Recherche; Bezugnahme auf diese frühere Recherche (falls eine frühere Recherche bei der internationalen Recherchenbehörde beantragt oder von ihr durchgeführt worden ist):

Datum (Tag/Monat/Jahr) Aktenzeichen Staat (oder regionales Amt)

Feld Nr. VIII KONTROLLISTE; EINREICHUNGSSPRACHE

Diese internationale Anmeldung enthält die folgende Anzahl von Blättern:

Antrag : 5
Beschreibung (ohne Sequenzprotokollteil) : 247 8
Ansprüche : 3
Zusammenfassung : 1
Zeichnungen :
Sequenzprotokollteil der Beschreibung : 2
Blattzahl insgesamt : 353 6

Dieser internationale Anmeldung liegen die nachstehend angekreuzten Unterlagen bei:

1. Blatt für die Gebührenberechnung
2. Gesonderte unterzeichnete Vollmacht
3. Kopie der allgemeinen Vollmacht; Aktenzeichen (falls vorhanden):
4. Begründung für das Fehlen einer Unterschrift
5. Prioritätsbeleg(e), in Feld Nr. VI durch folgende Zeilennummer gekennzeichnet: 1 + 2
6. Übersetzung der internationalen Anmeldung in die folgende Sprache:
7. Gesonderte Angaben zu hinterlegten Mikroorganismen oder anderem biologischen Material
8. Protokoll der Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenzen in computerlesbarer Form
9. Sonstige (einzelnen aufführen): Freimachtag, Telefonzettel

Abbildung der Zeichnungen, die mit der Zusammenfassung veröffentlicht werden soll (Nr.):

Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht wird: deutsch

Feld Nr. IX UNTERSCHRIFFT DES ANMELDERS ODER DES ANWALTS

Der Name jeder unterzeichnenden Person ist neben der Unterschrift zu wiederholen, und es ist anzugeben, sofern sich dies nicht eindeutig aus dem Antrag ergibt, in welcher Eigenschaft die Person unterzeichnet.

Roche Diagnostics GmbH

ppa.

i. V.

Dr. Kolb

Dr. Schwarz

Vom Anmeldeamt auszufüllen

1. Datum des tatsächlichen Eingangs dieser internationalen Anmeldung:

27 JAN 2000

(27. 01. 00)

2. Zeichnungen eingegangen:

3. Geändertes Eingangsdatum aufgrund nachträglich, jedoch fristgerecht eingegangener Unterlagen oder Zeichnungen zur Vervollständigung dieser internationalen Anmeldung:

4. Datum des fristgerechten Eingangs der angeforderten Richtigstellungen nach Artikel 11(2) PCT:

5. Internationale Recherchenbehörde (falls zwei oder mehr zuständig sind):

ISA /

6. Übermittlung des Recherchenexemplars bis zur Zahlung der Recherchengebühr aufgeschoben

Vom Internationalen Büro auszufüllen

Datum des Eingangs des Aktenexemplars beim Internationalen Büro:

**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM
GEBIET DES PATENTWESEN**

Absender: MIT DER INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN
PRÜFUNG BEAUFTRAGTE BEHÖRDE

Dr. Karl, LR-TR/II
PCT zur Info!

An:

ROCHE DIAGNOSTICS GMBH

- Patentabteilung -
D-68298 Mannheim
ALLEMAGNE

JG	Roche Diagnostics GmbH Patentabteilung			WS
SI				RA
Kn	11. Mai 2001 Erl.			
P	KO	KIL	S	SZ IR WB

**MITTEILUNG ÜBER DIE ÜBERSENDUNG
DES INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN
PRÜFUNGSBERICHTS**
(Regel 71.1 PCT)

Absendedatum
(Tag/Monat/Jahr) 10.05.2001

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts

5181/OA/WO-Im

WICHTIGE MITTEILUNG

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP00/00602

Internationales Anmelde datum (Tag/Monat/Jahr)
27/01/2000

Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr)
29/01/1999

Anmelder

ROCHE DIAGNOSTICS GMBH et al

1. Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß ihm die mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde hiermit den zu der internationalen Anmeldung erstellten internationalen vorläufigen Prüfungsbericht, gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen, übermittelt.
2. Eine Kopie des Berichts wird - gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen - dem Internationalen Büro zur Weiterleitung an alle ausgewählten Ämter übermittelt.
3. Auf Wunsch eines ausgewählten Amtes wird das Internationale Büro eine Übersetzung des Berichts (jedoch nicht der Anlagen) ins Englische anfertigen und diesem Amt übermitteln.
4. **ERINNERUNG**

Zum Eintritt in die nationale Phase hat der Anmelder vor jedem ausgewählten Amt innerhalb von 30 Monaten ab dem Prioritätsdatum (oder in manchen Ämtern noch später) bestimmte Handlungen (Einreichung von Übersetzungen und Entrichtung nationaler Gebühren) vorzunehmen (Artikel 39 (1)) (siehe auch die durch das Internationale Büro im Formblatt PCT/IB/301 übermittelte Information).

Ist einem ausgewählten Amt eine Übersetzung der internationalen Anmeldung zu übermitteln, so muß diese Übersetzung auch Übersetzungen aller Anlagen zum internationalen vorläufigen Prüfungsbericht enthalten. Es ist Aufgabe des Anmelders, solche Übersetzungen anzufertigen und den betroffenen ausgewählten Ämtern direkt zuzuleiten.

Weitere Einzelheiten zu den maßgebenden Fristen und Erfordernissen der ausgewählten Ämter sind Band II des PCT-Leitfadens für Anmelder zu entnehmen.

Name und Postanschrift der mit der internationalen Prüfung
beauftragten Behörde



Europäisches Patentamt
D-80298 München
Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 4465

Bevollmächtigter Bediensteter

Neumann, M

Tel. +49 89 2399-7351



VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM
GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 5181/OA/WO-Im	WEITERES VORGEHEN	siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)
Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/00602	Internationales Anmelde datum (Tag/Monat/Jahr) 27/01/2000	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 29/01/1999
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK G01N33/68		
Anmelder ROCHE DIAGNOSTICS GMBH et al		

1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.

2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 7 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.

Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt 3 Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

I Grundlage des Berichts
II Priorität
III Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erforderliche Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
IV Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
V Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erforderlichen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
VI Bestimmte angeführte Unterlagen
VII Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
VIII Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 25/05/2000	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 10.05.2001
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Tilkorn, A-C Tel. Nr. +49 89 2399 8688



**INTERNATIONALER VORLÄUFIGER
PRÜFUNGSBERICHT**

Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/00602

I. Grundlage des Berichts

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigefügt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17): Beschreibung, Seiten:*

1-24 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-19 eingegangen am 04/01/2001 mit Schreiben vom 03/01/2001

Sequenzprotokoll in der Beschreibung, Seiten:

1-2, eingereicht mit Schreiben vom 17.7.2000.

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- Beschreibung, Seiten:
- Ansprüche, Nr.:

**INTERNATIONALER VORLÄUFIGER
PRÜFUNGSBERICHT**

Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/00602

Zeichnungen, Blatt:

5. Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).
(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche 5-19
	Nein: Ansprüche 1-4
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche -
	Nein: Ansprüche 1-19
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche 1-19
	Nein: Ansprüche -

**2. Unterlagen und Erklärungen
siehe Beiblatt**

VII. Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung

Es wurde festgestellt, daß die internationale Anmeldung nach Form oder Inhalt folgende Mängel aufweist:
siehe Beiblatt

Zu Punkt V

Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:

D1: WO 93 24531 A
D2: WO 89 12069 A
D3: Clin. Endocrinol. (1997) 47 287-296

1 Neuheit (Art 33(2) PCT):

1.1 Der Gegenstand des **Anspruchs 1** wird von D1 (D1: Anspruch 9) vorweggenommen. In D1 wird die Herstellung des monoklonalen Antikörpers 1C7 detailliert beschrieben (Beispiel 1; S 7-8). Die beschriebene Methode einschließlich der Klonierung ist für den Fachmann nacharbeitbar. Entsprechend wird der Fachmann in die Lage versetzt auch einen zweiten Antikörper, der gegen BNP(1-76) gerichtet ist, zu produzieren, was dann wiederum auch die Durchführung eines Sandwich-Assays ermöglicht (D1: S 9 Abs 1; Ansprüche 7-9). Obwohl die mit Peptiden erzeugten Antikörper der vorliegenden Anmeldung (Anmeldung: S 20 Tabelle 1) natives pro-BNP nicht erkennen, heißt das nicht, daß die gemäß D1 (Beispiel 1) hergestellten Antikörper ebenfalls nicht das native pro-BNP erkennen, da in D1 andere Peptide eingesetzt werden (BNP(1-21), BNP(22-46), BNP(47-64)).
Folglich werden auch die **Ansprüche 2-4** von D1 neuheitsschädlich getroffen.

1.2 **Anspruch 5** ist neu, da in keinem der verfügbaren Dokumente ein Verfahren offenbart wird, das von zwei Antikörpern Gebrauch macht, die verschiedene Epitope des N-terminalen proBNP erkennen und eine Nachweisgrenze von unter 1 fmol/ml Patientenblut (= 1 pmol/l) aufweist.

1.3 **Anspruch 6** ist neu, da keines der verfügbaren Dokumente ein Nachweisverfahren auf der Grundlage von BNP offenbart, das eine Differenzierung von gesunden und Patienten mit Herzinsuffizienz der NYHA Klassen I-IV erlaubt. Der abhängige **Anspruch 7** ist dementsprechend ebenfalls neu; das gleiche gilt für den unabhängigen **Verwendungsanspruch 8**.

1.4 **Anspruch 9** ist neu, da keines der verfügbaren Dokumente rekombinantes N-terminales proBNP offenbart. Entsprechend sind auch die Verwendung des rekombinanten N-terminalen proBNP (**Ansprüche 10, 11**), spezifische Antikörper (**Ansprüche 12-16**), deren Herstellung (**Ansprüche 18, 19**) und die zugehörigen Zelllinien (**Anspruch 17**) neu.

2 Erfinderische Tätigkeit (Art 33(3) PCT):

2.1 Das einzige zusätzliche technische Merkmal in **Anspruch 5** bezieht sich auf das Ergebnis, das mit der Erfindung erzielt werden soll, nämlich auf eine niedrige Nachweisgrenze für N-terminales proBNP (< 1 fmol/ml). Da das Verfahren zum Nachweis von N-terminalen proBNP in einer Probe (**Anspruch 1**) nicht neu ist, scheint die beanspruchte Nachweisgrenze durch normales Experimentieren mit spezifischen Antikörpern erreichbar zu sein (Art 33(3) PCT).

2.2 **Anspruch 6** scheint nicht erforderlich zu sein:
D3, das als nächster Stand der Technik angesehen wird, beschreibt, daß das N-terminale proBNP (NT-proBNP) als Marker von Herzinsuffizienz verwendet werden kann. Der NT-proBNP Spiegel ist bei NYHA Klasse I Patienten gegenüber Gesunden erhöht, und steigt mit wachsender Herzinsuffizienz, wobei der Assay nach D3 eine Differenzierung von Gesunden und NYHA Klasse I-IV Patienten ermöglicht (D3: S 287 Spalt 2 Abs 2, 3; S 291 Fig. 3). Das Verfahren zur Bestimmung des NT-proBNP, das in D3 verwendet wird, ist ein Radioimmunassay, der von einem Antiserum Gebrauch, das gegen humanes proBNP(1-13) erzeugt wurde (D3: S 288 Spalte 2 Abs 1). D3 unterscheidet sich demnach vom Gegenstand des Anspruchs 6 im Nachweisverfahren. Während gemäß Anspruch 6 zwei Antikörper eingesetzt werden, die unterschiedliche Epitope auf dem N-terminalen proBNP erkennen, verwendet die Methode nach D3 nur einen Antikörper in einem kompetitiven Testformat (D3: S 288 Spalte 2 Abs 1).

Die Aufgabe, die in Anspruch 6 gelöst wird, besteht darin, einen empfindlichen Assay bereitzustellen, der mit kurzen Inkubationszeiten auskommt (siehe Anmeldung: S 4 Abs 3).

Sandwichassays mit zwei Antigen-spezifischen Antikörpern sind dem Fachmann geläufig (z.B. D1: Anspruch 9; S 8 letzte Zeile- S 9 Abs 1) ebenso wie ihre Vorteile

wie z.B. die kürzeren Inkubationszeiten (D1: S 9 Abs 1). Dementsprechend scheint die Lehre aus D3, nämlich die Verwendung des NT-proBNP als Marker zur Differenzierung von gesundem und NYHA Klasse I-IV Plasma in Verbindung mit einem Sandwich-ELISA den Gegenstand des Anspruchs 6 nahezulegen. Entsprechend scheinen auch die **Ansprüche 7** und **8** nicht erfinderisch zu sein.

2.3 **Anspruch 9** scheint dem Art 33(3) PCT nicht gerecht zu werden.

Die Bedeutung des N-terminalen proBNP als diagnostischer Indikator oder Predictor für Herzinsuffizienz ist seit langem bekannt (z.B. D1: S 3 Z 2-6) und insbesondere die Verwendung von Antikörpern gegen das N-terminale proBNP Peptid in Immunoassays wird im Stand der Technik beschrieben (z.B. D1: S 3 Z 7- S 5 Z 11). D1, das als nächster Stand der Technik angesehen wird, beschreibt die Herstellung (D1: S 6 Abs 3) von proBNP(1-76) durch chemische Synthese, welches eine lange bekannte Standardmethode zur Herstellung von Peptiden darstellt. Darüberhinaus beschreibt D1 die Verwendung von N-terminalem proBNP(1-76) für die Herstellung von Antikörpern (D1: Anspruch 15). D1 beschreibt jedoch nicht die Herstellung und Verwendung von rekombinantern BNP(1-76).

Die Aufgabe, die in Anspruch 9 gelöst wird, besteht demnach darin, eine alternative Methode zur Herstellung eines proBNP(1-76) Peptides bereitzustellen. D2 offenbart die cDNA Sequenz von humanem BNP. In Figur 5 (D2: S 16 Z 24-27) wird die DNA Sequenz des humanen BNP (kodierende Region des Plasmids phBNP-1) sowie die zugehörige Peptidsequenz offenbart. In Beispiel 5 (S 41) von D2 wird die Klonierung des humanen BNP beschrieben. Darüberhinaus beschreibt D2 die Herstellung des BNP in rekombinanten Expressionssystemen (D2: S 20 Z 18- S 26 Z 25).

Die Bedeutung und Verwendung des N-terminalen proBNP wird in D1 beschrieben.

Darüberhinaus ist die Herstellung eines rekombinanten Proteins auf der Grundlage einer bekannten cDNA Sequenz eine Standardtechnik für den Fachmann zu sein.

Zusammenfassend scheint die Sequenz, die in D2 offenbart ist, in Kombination mit der Bedeutung und Verwendung, die in D1 beschrieben werden, den Gegenstand des **Anspruchs 9** nahezulegen.

Da die Herstellung von Antikörpern mit Peptiden und Proteinen ebenfalls einem

dem Fachmann geläufige Technik ist und z.B. auch in D1 (S 7-8) beschrieben ist, scheinen auch die **Ansprüche 12, 14-16, 18** (D1: S 9 Abs 2) und **19** (D1: S 7 Abs 2- S 8 Abs. 3) nicht dem Art 33(3) PCT gerecht zu werden.

Anspruch 13 bezieht sich auf Antikörper gegen den Bereich der Aminosäuren 10-66 des N-terminalen proBNP. Die Auswahl dieser Region soll gewährleisten, daß der Analyt auch dann noch erfaßt wird, wenn die N- oder C-terminalen Aminosäuren bereits von Proteasen verdaut worden sind. Entgegenzuhalten ist D1, welches den monoklonalen Antikörper 1C7 beschreibt, der spezifisch mit der Sequenz BNP(47-64) bindet. Darüberhinaus kann mit dem Verfahren, das in D1 beschrieben wird auch ein Antikörper produziert werden, der gegen das Peptid BNP(22-46) gerichtet ist (D1: S 7 Beispiel 1 Abs 1)). Entsprechend scheint Anspruch 13 ein eigenes erfinderisches Konzept zu fehlen.

Das gleiche gilt für die **Ansprüche 15-17**, die sich auf spezifische hinterlegte Antikörper und die produzierenden Zelllinien beziehen.

Zu Punkt VII

Im Widerspruch zu den Erfordernissen der Regel 5.1 a) ii) PCT werden in der Beschreibung weder der in dem Dokument D2 offenbarte einschlägige Stand der Technik noch dieses Dokument angegeben.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweis von N-terminalem proBNP in einer Probe dadurch gekennzeichnet, daß mindestens zwei Antikörper, die verschiedene Epitope des N-terminalen proBNP erkennen, verwendet werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, daß die Antikörper gleichzeitig am N-terminalen proBNP binden können.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2 dadurch gekennzeichnet, daß das Verfahren als heterogenes Verfahren durchgeführt wird
4. Verfahren nach Anspruch 3 dadurch gekennzeichnet, daß das Verfahren im Sandwichformat durchgeführt wird
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche dadurch gekennzeichnet, daß die untere Nachweisgrenze für N-terminales proBNP unter 1 fmol/ml eingesetzter Patientenprobe liegt.
6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche dadurch gekennzeichnet, daß mittels der erhaltenen Werte eine Differenzierung nach Proben von gesunden Patienten und Proben von Patienten mit Herzinsuffizienz der NYHA-Klassen I bis IV vorgenommen werden kann
7. Verfahren nach Anspruch 6 dadurch gekennzeichnet, daß anhand der erhaltenen Werte eine Differenzierung zwischen Proben von gesunden Patienten und Proben von Patienten der NYHA-Klasse I vorgenommen werden kann.
8. Verwendung des Verfahrens gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche zur Differenzierung zwischen Proben von gesunden Patienten und Proben von Patienten der NYHA-Klassen I bis IV

9. Rekombinantes N-terminales proBNP
10. Verwendung von rekombinantem N-terminalen proBNP als Standard in einem Verfahren zum Nachweis von N-terminalem proBNP gemäß den Ansprüchen 1 bis 7.
11. Verwendung von rekombinantem N-terminalen proBNP zur Herstellung von Antikörpern gegen N-terminales proBNP.
12. Antikörper gegen rekombinantes N-terminales proBNP.
13. Antikörper gemäß Anspruch 12 dadurch gekennzeichnet, daß sie im Bereich von Aminosäure 10 bis 66 des N-terminalen proBNP spezifisch binden.
14. Antikörper gemäß Anspruch 12 oder 13 erhältlich durch Immunisierung eines geeigneten Organismus mit rekombinant hergestelltem N-terminalen proBNP.
15. Antikörper nach den Ansprüchen 12 bis 14, erhältlich aus den am 26.01.1999 bei der DSMZ hinterlegten Zelllinien M 10.1.11 (DSM ACC 2386) oder M 13.4.14 (DSM ACC 2387).
16. Antikörper gemäß Anspruch 15, die in äquivalenter Weise mit N-terminalem proBNP hergestellt wurden wie die Antikörper, die von den Zelllinien M 10.1.11 (DSM ACC 2386) oder M 13.4.14 (DSM ACC 2387), produziert werden.
17. Zelllinien M 10.1.11 (DSM ACC 2386) oder M 13.4.14 (DSM ACC 2387) hinterlegt am 26.01.1999 bei der DSMZ.
18. Verfahren zur Herstellung von polyklonalen Antikörpern gemäß den Ansprüchen 12 bis 14 oder 16, enthaltend die Schritte Immunisieren eines geeigneten Organismus mit rekombinant hergestelltem N-terminalem proBNP, Isolieren der Antikörper, Screenen nach den reaktivsten Epitopen und Aufreinigung der Antikörper über Immunsorption an geeigneten Peptiden.

19. Verfahren zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern gemäß den Ansprüchen 12 bis 16, enthaltend die Schritte Immunisieren eines geeigneten Organismus mit rekombinant hergestelltem N-terminalem proBNP und Auswahl der Klone bezüglich der Reaktivität der Antikörper mit nativem N-terminalem proBNP in verschiedenen Pools von Patientenserien.

Translation
09/998442

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 5181/OA/WO-Im	FOR FURTHER ACTION SeeNotificationofTransmittalofInternational Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP00/00602	International filing date (day/month/year) 27 January 2000 (27.01.00)	Priority date (day/month/year) 29 January 1999 (29.01.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC G01N 33/68		
Applicant ROCHE DIAGNOSTICS GMBH		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of <u>7</u> sheets, including this cover sheet.
<input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).
These annexes consist of a total of <u>3</u> sheets.
3. This report contains indications relating to the following items:
I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report
II <input type="checkbox"/> Priority
III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention
V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited
VII <input checked="" type="checkbox"/> Certain defects in the international application
VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 25 May 2000 (25.05.00)	Date of completion of this report 10 May 2001 (10.05.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP00/00602

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

 the international application as originally filed the description:

pages 1-24, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

 the claims:

pages _____, as originally filed

pages _____, as amended (together with any statement under Article 19) _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

pages 1-19, filed with the letter of 03 January 2001 (03.01.2001)

 the drawings:

pages _____, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

 the sequence listing part of the description:

pages _____, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item. These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

 the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)). the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)). the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

 contained in the international application in written form. filed together with the international application in computer readable form. furnished subsequently to this Authority in written form. furnished subsequently to this Authority in computer readable form. The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished. The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.4. The amendments have resulted in the cancellation of: the description, pages _____ the claims, Nos. _____ the drawings, sheets/fig _____5. This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/EP 00/00602

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	5 - 19	YES
	Claims	1 - 4	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1 - 19	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1 - 19	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Reference is made to the following documents:

D1: WO-A-93/24531

D2: WO-A-89/12069

D3: Clin. Endocrinol. (1997) 47 287-296

1. Novelty (PCT Article 33(2)):

1.1 The subject matter of **Claim 1** is anticipated by D1 (D1: Claim 9). D1 describes in detail the production of the monoclonal antibody 1C7 (Example 1; pages 7-8). The method described, including the cloning, can be reproduced by a person skilled in the art. Accordingly, a person skilled in the art is also able to produce a second antibody directed against BNP(1-76), which then also enables a sandwich assay to be carried out (D1: page 9, paragraph 1; Claims 7-9). Although the antibodies of the present application produced by peptides (application: page 20, Table 1) do not detect native pro-BNP, this does not mean that the antibodies produced as per D1 (Example 1) likewise do not detect the native pro-BNP since other peptides are used in D1 (BNP(1-21), BNP(22-46), BNP(47-64)).

Therefore the novelty of **Claims 2 to 4** is also anticipated by D1.

- 1.2 **Claim 5** is novel since none of the available documents discloses a method which uses two antibodies that detect different antigenic determinants of N-terminal proBNP and have a detection limit of less than 1fmol/ml patient blood (= 1 pmol/l).
- 1.3 **Claim 6** is novel since none of the available documents discloses a BNP-based detection method which permits differentiation between healthy patients and those suffering cardiac insufficiency of NYHA Classes I - IV. Accordingly dependent **Claim 7** is likewise novel; the same applies to independent **use Claim 8**.
- 1.4 **Claim 9** is novel since none of the available documents discloses recombinant N-terminal proBNP. Accordingly the use of recombinant N-terminal proBNP (**Claims 10 and 11**), specific antibodies (**Claims 12 to 16**), their production (**Claims 18 and 19**) and the associated cell lines (**Claim 17**) are also novel.

2. Inventive step (PCT Article 33(3)):

- 2.1 The single additional technical feature in **Claim 5** concerns the result to be attained with the invention, namely a low N-terminal proBNP detection limit (< 1 fmol/ml). Since the method of detecting N-terminal proBNP in a sample (Claim 1) is not novel, the claimed detection limit appears to be attainable by normal experimentation with specific

antibodies (PCT Article 33(3)).

2.2 **Claim 6** does not appear to be inventive:

D3, which is considered the closest prior art, specifies that the N-terminal proBNP (NT-proBNP) can be used as a cardiac insufficiency marker. The NT-proBNP level in NYHA Class 1 patients is higher than in healthy patients and increases as the cardiac insufficiency increases, the D3 assay permitting differentiation between healthy patients and NYHA Class I - IV patients (D3: page 287, column 2, paragraphs 2, 3; page 291, Figure 3). The method for determining NT-proBNP which is used in D3 is a radio immunoassay that uses an antiserum produced to act against human proBNP (1-13) (D3: page 288, column 2, paragraph 1). Consequently D3 differs from the subject matter of Claim 6 by the detection method. Whilst two antibodies detecting different antigenic determinants on N-terminal proBNP are used according to Claim 6, the D3 method uses only one antibody in a competitive test format (D3: page 288, column 2, paragraph 1).

The object achieved in Claim 6 is that of preparing a sensitive assay which only requires short incubation periods (see application, page 4, paragraph 3).

A person skilled in the art is familiar with sandwich assays with two antigen-specific antibodies (e.g. D1: Claim 9; page 8, last line - page 9, paragraph 1), and with their advantages such as, for example, the shorter incubation periods (D1: page 9, paragraph 1). Accordingly the teaching of D3, that is, the use of NT-proBNP as marker for

distinguishing between healthy plasma and NYHA Class I - IV plasma in conjunction with a sandwich ELISA appears to suggest the subject matter of Claim 6. Therefore **Claims 7 and 8** likewise appear to be non-inventive.

2.3 **Claim 9** does not appear to comply with PCT Article 33(3). The significance of N-terminal proBNP as diagnostic indicator or predictor for cardiac insufficiency has been known for a long time (e.g. D1: page 3, lines 2-6) and the use of antibodies against the N-terminal proBNP peptide in immunoassays in particular is described in the prior art (e.g. D1: page 3, line 7 - page 5, line 11). D1, which is considered the closest prior art, describes the production (D1: page 6, paragraph 3) of proBNP (1-76) by chemical synthesis, which is a long-known standard method of producing peptides. Moreover, D1 describes the use of N-terminal proBNP(1-76) for producing antibodies (D1: Claim 15). However, D1 does not describe the production and use of recombinant BNP(1-76).

The object achieved in Claim 9 is consequently that of devising an alternative method for producing a proBNP(1-76) peptide. D2 discloses the cDNA sequence of human BNP. Figure 5 (D2: page 16, lines 24-27) discloses the DNA sequence of human BNP (coding region of the plasmid phBNP-1) and the associated peptide sequence. Example 5 (page 41) of D2 describes the cloning of human BNP. Moreover, D2 describes the production of BNP in recombinant expression systems (D2: page 20, line 18 - page 26, line 25).

The significance and use of N-terminal proBNP is described in D1.

Furthermore, the production of a recombinant protein on the basis of a known cDNA sequence is a standard technique for a person skilled in the art.

In conclusion, the sequence disclosed in D2 in combination with the significance and use described in D1 appears to render the subject matter of **Claim 9** obvious.

Since the production of antibodies with peptides and proteins is likewise a familiar technique for a person skilled in the art and is also described, for example, in D1 (pages 7-8), **Claims 12, 14-16, 18** (D1: page 9, paragraph 2) and **19** (D1: page 7, paragraph 2 - page 8, paragraph 3) likewise appear not to comply with PCT Article 33(3).

Claim 13 concerns antibodies against the 10-66 range of amino acids of N-terminal proBNP. The choice of this range is intended to ensure that the analyte can also be detected when the N or C-terminal amino acids have already been digested by proteases. D1 can be cited against this since it describes the monoclonal antibody 1C7 which specifically binds to the BNP(47-64) sequence. Moreover, the D1 method can also produce an antibody which is directed against the BNP(22-46) peptide (D1: page 7, Example 1, paragraph 1). Therefore Claim 13 appears to be lacking an inherent inventive concept.

The same applies to **Claims 15 to 17**, which concern specific deposited antibodies and the producing cell

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/EP 00/00602

lines.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No. PCT/EP 00/00602
--

VII. Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

Contrary to the requirements of PCT Rule 5.1(a)(ii), the description did not cite D2 and it did not briefly outline the relevant prior art contained therein.

REPLACED BY
ART 34 AMDT

Claims

1. Method of identifying N-terminal proBNP in a sample, wherein at least two antibodies detecting different epitopes of the N-terminal proBNP are used.
2. Method as claimed in claim 1, wherein the antibodies can bind simultaneously to the N-terminal proBNP.
3. Method as claimed in claim 1 or 2, wherein the method is performed heterogeneously.
4. Method as claimed in claim 3, wherein the method is performed as a sandwich format.
5. Method as claimed in one of the aforementioned claims, wherein the lower detection limit for N-terminal proBNP is under 1 fmol/ml.
6. Method as claimed in one of the aforementioned claims, wherein by means of the values obtained a differentiation of the samples taken from healthy patients and patients with heart failure of the NYHA-classes I to IV can be made.
7. Method as claimed in claim 6, wherein by means of the values obtained a differentiation of the samples taken from healthy patients and patients of NYHA-class I can be made.
8. Use of the method according to one of the aforementioned claims for the differentiation between samples taken from healthy patients and patients with heart failure of NYHA-classes I to IV.

9. Recombinant N-terminal proBNP

10. Use of recombinant N-terminal proBNP as a standard in a method of identifying N-terminal proBNP according to the claims 1 to 7.

11. Use of recombinant N-terminal proBNP for the production of antibodies against N-terminal proBNP.

12. Antibodies against recombinant N-terminal proBNP.

13. Antibodies as claimed in claim 12, wherein they bind specifically in the amino acid range 10 to 66 of the N-terminal proBNP.

14. Antibodies as claimed in claim 12 or 13 obtainable by immunization of a suitable organism with recombinantly produced N-terminal proBNP.

15. Antibodies as claimed in claims 12 to 14, obtainable from the cell lines M 10.1.11 or M 13.4.14.

16. Antibodies as claimed in claim 15 and produced in an equivalent way with N-terminal proBNP compared to those produced from the cell lines M 10.1.11 or M 13.4.14.

17. Cell lines M 10.1.11 or M 13.4.14 deposited with the DSMZ on 26.01.1999.

18. Method for the production of polyclonal antibodies as claimed in claims 12 to 14 or 16, containing the steps immunization of a suitable organism with recombinantly produced N-terminal proBNP, isolation of antibodies, screening for the most reactive epitopes and purification of the antibodies by immunosorption with appropriate peptides.

19. Method for the production of monoclonal antibodies as claimed in claims 12 to 16, containing the steps immunization of a suitable organism with recombinantly produced N-terminal proBNP and selection of the clones regarding the antibody reactivity with native N-terminal proBNP in different pools of patient sera.

Afia

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 5181/0A/WO-Im	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 00/ 00602	Internationales Anmelde datum (Tag/Monat/Jahr) 27/01/2000	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 29/01/1999
Anmelder ROCHE DIAGNOSTICS GMBH et al		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 3 Blätter.

Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

in der internationalen Anmeldung in Schriftlicher Form enthalten ist.

zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. **Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen** (siehe Feld I).

3. **Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung** (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der **Bezeichnung der Erfindung**

wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der **Zusammenfassung**

wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. ---

wie vom Anmelder vorgeschlagen

weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

keine der Abb.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/00602

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 G01N33/68 C07K14/58 C07K16/26 C07K16/18 C12N15/06

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

WPI Data, PAJ, BIOSIS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 93 24531 A (DZIEGLEWSKA HANNA EVA ; MEDINNOVA SF (NO); HALL CHRISTIAN (NO)) 9. Dezember 1993 (1993-12-09) in der Anmeldung erwähnt Ansprüche 1,9 ---	1-4, 9-14, 18
Y	HUNT P J ET AL: "IMMUNOREACTIVE AMINO-TERMINAL PRO-BRAIN NATRIURETIC PEPTIDE (NT-PROMBNP): A NEW MARKER OF CARDIAC IMPAIRMENT" CLINICAL ENDOCRINOLOGY, GB, BLACKWELL SCIENTIFIC PUBLICATIONS, OXFORD, Bd. 47, 1997, Seiten 287-296, XP000913471 ISSN: 0300-0664 Seite 287, Spalte 2, Zeile 15 - Zeile 20 ---	1,5-8
X	---	1,5-8
X	---	9-14, 18
		-/-



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

10. August 2000

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

21/08/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Gundlach, B

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	DAGGUBATTI, S. ET AL.: "Adrenomedullin, endothelin, neuropeptide Y, atrial, brain, and C-natriuretic prohormone peptides compared as early heart failure indicators" CARDIOVASCULAR RESEARCH, Bd. 36, 1997, Seiten 246-255, XP000913576 Seite 253, Spalte 2, Absatz 1	1,5-8
X		9-14, 18
X	HUNT P J ET AL: "THE AMINO-TERMINAL PORTION OF PRO-BRAIN NATRIURETIC PEPTIDE (PRO-BNP) CIRCULATES IN HUMAN PLASMA" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, US, ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, Bd. 214, Nr. 3, 1995, Seiten 1175-1183, XP000907386 ISSN: 0006-291X in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	9-14, 18
A		1-8, 15-17, 19
X	HUNT P J ET AL: "THE ROLE OF THE CIRCULARION IN PROCESSING PRO-BRAIN NATRIURETIC PEPTIDE (PROBNP) TO AMINO-TERMINAL BNP AND BNP-32" PEPTIDES, US, ELMFSORD, Bd. 18, Nr. 10, 1997, Seiten 1475-1481, XP000913698 ISSN: 0196-9781 das ganze Dokument	9-14, 18
A		1-8, 15-17, 19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/00602

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9324531	A	09-12-1993	AT 172989 T	15-11-1998
			AU 667223 B	14-03-1996
			AU 4340593 A	30-12-1993
			CA 2136961 A	09-12-1993
			DE 69321955 D	10-12-1998
			DE 69321955 T	10-06-1999
			EP 0648228 A	19-04-1995
			ES 2123056 T	01-01-1999
			JP 7507210 T	10-08-1995
			US 5786163 A	28-07-1998

BUDAPESTER VERTRAG UBER DIE INTERNATIONALE
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN
FUR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

INTERNATIONALES FORMBLATT

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Str. 116
68305 Mannheim

EMPFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG.
ausgestellt gemäß Regel 7.1 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

<p>I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS</p> <p>Vom HINTERLEGER zugewiesenes Bezeichnungszeichen: MAK<proBNP>M 13.4.14</p>		<p>Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugewiesene EINGANGSNUMMER:</p> <p>DSM ACC2387</p>
<p>II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG</p> <p>Mit dem unter I. bezeichneten Mikroorganismus wurde</p> <p>(<input type="checkbox"/>) eine wissenschaftliche Beschreibung (<input type="checkbox"/>) eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung</p> <p>eingereicht. (Zutreffendes ankreuzen).</p>		
<p>III. EINGANG UND ANNAHME</p> <p>Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I. bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am 1999-01-26 (Datum der Ersthinterlegung) eingegangen ist.</p>		
<p>IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG</p> <p>Der unter I. bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser Internationalen Hinterlegungsstelle am eingegangen (Datum der Ersthinterlegung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Ersthinterlegung in eine Hinterlegung gemäß Budapest Vertrag ist am eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung).</p>		
<p>V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE</p> <p>Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH</p> <p>Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig</p> <p>Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Personen) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:</p> <p><i>V. Wels</i></p> <p>Datum: 1999-02-11</p>		

¹ Falls Regel 6.4 Buchstabe a zutrifft, ist dies der Zeitpunkt, zu dem der Status einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben worden ist.

BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

INTERNATIONALES FORMBLATT

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Str. 116

68305 Mannheim

LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG
ausgestellt gemäß Regel 10.2 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

<p>I. HINTERLEGER</p> <p>Name: Roche Diagnostics GmbH Sandhofer Str. 116 Anschrift: 68305 Mannheim</p>	<p>II. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS</p> <p>Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM ACC2387</p> <p>Datum der Hinterlegung oder Weiterleitung: 1999-01-26</p>
<p>III. LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG</p> <p>Die Lebensfähigkeit des unter II genannten Mikroorganismus ist am 1999-01-27 geprüft worden. Zu diesem Zeitpunkt war der Mikroorganismus</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> lebensfähig <input type="checkbox"/> nicht mehr lebensfähig</p>	
<p>IV. BEDINGUNGEN, UNTER DENEN DIE LEBENSFÄHIGKEITSPRÜFUNG DURCHGEFÜHRT WORDEN IST</p> <p> </p>	
<p>V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE</p> <p>Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig</p> <p>Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:</p> <p style="text-align: right;"><i>U. Weiß</i></p> <p>Datum: 1999-02-11</p>	

Angabe des Datums der Ersthinterlegung. Wenn eine erneute Hinterlegung oder eine Weiterleitung vorgenommen worden ist, Angabe des Datums der jeweils letzten erneuten Hinterlegung oder Weiterleitung.
In den in Regel 10.2 Buchstabe a Ziffer ii und iii vorgesehenen Fällen Angabe der letzten Lebensfähigkeitsprüfung.
Zutreffendes ankreuzen.
Ausfüllen, wenn die Angaben beantragt worden sind und wenn die Ergebnisse der Prüfung negativ waren.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweis von N-terminalem proBNP in einer Probe dadurch gekennzeichnet, daß mindestens zwei Antikörper, die verschiedene Epitope des N-terminalen proBNP erkennen, verwendet werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, daß die Antikörper gleichzeitig am N-terminalen proBNP binden können.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2 dadurch gekennzeichnet, daß das Verfahren als heterogenes Verfahren durchgeführt wird
4. Verfahren nach Anspruch 3 dadurch gekennzeichnet, daß das Verfahren im Sandwichformat durchgeführt wird
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche dadurch gekennzeichnet, daß die untere Nachweisgrenze für N-terminales proBNP unter 1 fmol/ml liegt.
6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche dadurch gekennzeichnet, daß mittels der erhaltenen Werte eine Differenzierung nach Proben von gesunden Patienten und Proben von Patienten mit Herzinsuffizienz der NYHA-Klassen I bis IV vorgenommen werden kann
7. Verfahren nach Anspruch 6 dadurch gekennzeichnet, daß anhand der erhaltenen Werte eine Differenzierung zwischen Proben von gesunden Patienten und Proben von Patienten der NYHA-Klasse I vorgenommen werden kann.
8. Verwendung des Verfahrens gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche zur Differenzierung zwischen Proben von gesunden Patienten und Proben von Patienten der NYHA-Klassen I bis IV

9. Rekombinantes N-terminales proBNP
10. Verwendung von rekombinantem N-terminalen proBNP als Standard in einem Verfahren zum Nachweis von N-terminalem proBNP gemäß den Ansprüchen 1 bis 7.
11. Verwendung von rekombinantem N-terminalen proBNP zur Herstellung von Antikörpern gegen N-terminales proBNP.
12. Antikörper gegen rekombinantes N-terminales proBNP.
13. Antikörper gemäß Anspruch 12 dadurch gekennzeichnet, daß sie im Bereich von Aminosäure 10 bis 66 des N-terminalen proBNP spezifisch binden.
14. Antikörper gemäß Anspruch 12 oder 13 erhältlich durch Immunisierung eines geeigneten Organismus mit rekombinant hergestelltem N-terminalen proBNP.
15. Antikörper nach den Ansprüchen 12 bis 14, erhältlich aus der Zelllinien M 10.1.11 oder M 13.4.14
16. Antikörper gemäß Anspruch 15, die in äquivalenter Weise mit N-terminalem proBNP hergestellt wurden wie die Antikörper, die von den Zelllinien M 10.1.11 oder M 13.4.14, produziert werden.
17. Zelllinien M 10.1.11 oder M 13.4.14 hinterlegt am 26.01.1999 bei der DSMZ.
18. Verfahren zur Herstellung von polyklonalen Antikörpern gemäß den Ansprüchen 12 bis 14 oder 16, enthaltend die Schritte Immunisieren eines geeigneten Organismus mit rekombinant hergestelltem N-terminalen proBNP, Isolieren der Antikörper, Screenen nach den reaktivsten Epitopen und Aufreinigung der Antikörper über Immunsorption an geeigneten Peptiden.

19. Verfahren zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern gemäß den Ansprüchen 12 bis 16, enthaltend die Schritte Immunisieren eines geeigneten Organismus mit rekombinant hergestelltem N-terminalem proBNP und Auswahl der Klone bezüglich der Reaktivität der Antikörper mit nativem N-terminalem proBNP in verschiedenen Pools von Patientenserien.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Roche Diagnostics GmbH

<120> Verfahren zum Nachweis von N-terminalem proBNF

<130> 51810AWO-SZ

<140>

<141>

<160> 6

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 17

<212> DNA

<213> E. coli

<400> 1

ccggatccca cccgcgtg

17

<210> 2

<211> 79

<212> DNA

<213> E. coli

<400> 2

cgggatccca ccccttgggtt tttttttttt ccgtttccgaa cctggaaacc tccgggtctgc 60
aggAACAGCG TAACCACCT 79

<210> 3

<211> 70

<212> DNA

<213> E. coli

<400> 3

cggttccagg gaggtctttt caacctgcag ttctggacaat ttacccttca ggtggttacg 60
ctgttccgtc 70

<210> 4

<211> 71

<212> DNA

<213> E. coli

<400> 4

caacccatcc tggaaaccatcc ccaggaaatcc ccgcgtccca ccgcgtttttt gaaatccgt 60

jaagtzaacta c

71

<210> 5.

<211> 87

<212> DNA

<213> E. col1

<400> 5

ccccaaaggctta acggcgagca cccagggtgt acagaaccat tttacgggtgt ccacggataac 60
cttcggtagc aacttccacgg gattttcc 87

<210> 6

<211> 19

<212> DNA

<213> E. coli

<400> 6

ccccaaacctta acacccggac

19

ROCHE DIAGNOSTICS GMBH

5181/00/DE

Verfahren zum Nachweis von N-terminalem proBNP

5

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis von N-terminalem proBNP in einer Probe mit mindestens zwei Antikörpern, die verschiedene Epitope des N-terminalen proBNP erkennen. Das Verfahren kann zur Differenzierung bzw. Klassifizierung von Proben von Gesunden und Proben von Patienten der NYHA-Klassen I bis 10 IV angewendet werden. Außerdem betrifft die Erfindung rekombinantes N-terminales proBNP, dessen Verwendung als Standard in einem Verfahren zum Nachweis von N-terminalem proBNP, sowie Antikörper, die rekombinantes N-terminales proBNP erkennen, und deren Herstellung.

15 Herzinsuffizienz ist ein weit verbreitetes Phänomen insbesondere in der westlichen Welt. Unter Herzinsuffizienz versteht man gemäß Roche Lexikon Medizin (1993, Urban & Schwarzenberg) das akute oder chronische Unvermögen des Herzens, bei Belastung oder schon im Ruhezustand den für den Stoffwechsel erforderlichen Blatauswurf aufzubringen bzw. den venösen Rückfluss aufzunehmen (sogenannter Backward- und Forward-Failure). Es liegt also eine Schwäche der Pumpenfunktion vor. Die Ursachen für Herzinsuffizienz sind vielschichtig. Unter anderem sind hier entzündliche und degenerative Veränderungen des Herzmuskels, koronare Durchblutungsstörung, Herzinfarkt und Verletzungen zu nennen. Dies führt zu Veränderungen am peripheren Blutkreislauf, Störung der Atmung, der Nierenfunktion und des Elektrolytstoffwechsels 20 (Ödeme) und zu verminderter Leistungsfähigkeit der Skelettmuskulatur.

Gemäß der New York Heart Association (NYHA) wird Herzinsuffizienz anhand von körperlichen Belastungstests in sogenannte NYHA-Klassen eingeteilt: I bedeutet völlige Beschwerdefreiheit bei normaler körperlicher Belastung, II bedeutet leichte Einschränkung der körperlichen Belastbarkeit, III bedeutet starke Einschränkung der Belastbar- 30

keit, IV bedeutet, daß bei jeder körperlichen Tätigkeit eine Zunahme der meist auch in Ruhe bestehenden Insuffizienzzeichen stattfindet.

Zu einer effektiven medikamentösen Behandlung von Herzinsuffizienz mittels Glykosiden, Vasodilatoren, ACE-Hemmern und/oder β -Blockern ist es erforderlich, zuvor das Vorliegen einer Herzinsuffizienz genau zu diagnostizieren und möglichst auch nach ihrem Schweregrad zu klassifizieren und zusätzlich den Verlauf der Behandlung zu monitoren.

Im Stand der Technik werden einige Serummarker zur frühen Diagnose von Herzinsuffizienz wie beispielsweise ANP (N-terminal atrial natriuretic peptide hormon) und pro-ANP, CNP (C-natriuretic peptide), Adrenomedullin, Neuropeptid Y, Endothelin und BNP (brain natriuretic peptide) diskutiert. ANP und proANP sind prinzipiell als Marker zur Diagnose von Herzinsuffizienz geeignet, besitzen jedoch eine geringe Stabilität bzw. kurze Halbwertzeit im Blut, was diagnostische Messungen erschwert (Clin. Sci. 95(3) 15 (1998), 235-239; Cleland et al., Heart 75 (1996), 410-413).

Ein häufig zitiert und als aussagekräftig angesehener Marker ist das BNP (brain natriuretic peptide). BNP wurde ursprünglich im Gehirn von Schweinen identifiziert. Es handelt sich dabei um ein Herzhormon, das strukturelle und funktionelle Ähnlichkeit mit ANP (atrial natriuretic peptide) besitzt (Sudoh et al., Nature 332 (1988), 78-81). Das humane BNP, das aus 32 Aminosäuren besteht, wird vor allem von den Herzventrikeln sekretiert und zirkuliert im humanen Blutplasma. Der Einsatz von BNP als diagnostischer Marker ist beispielsweise aus der EP-A-0 542 255 bekannt. BNP besitzt eine intramolekulare Disulfidbrücke und ist als Analyt vermutlich aufgrund seiner physiologischen Funktion als Hormon, das schnell wieder abgebaut werden muß, nicht sehr stabil und daher als diagnostischer Marker nur beschränkt geeignet (Masuta et al., Clin. Chem. 25 Vol. 44 No. 6 Supplement A (1998), 130; Tsuji et al., Clin. Chem. 40 (1994), 672).

Das Vorläufer-Molekül von BNP, das proBNP, besteht aus 108 Aminosäuren, von denen die zuvor beschriebenen 32 C-terminalen Aminosäuren (77-108), die als BNP bezeichnet werden, die eigentliche hormonelle Wirkung entfalten. Die vom Precursor abgespaltenen

N-terminalen Aminosäuren 1-76 werden als N-terminales proBNP bezeichnet. Neben BNP (77-108) zirkuliert auch N-terminales proBNP (1-76) im Plasma (Hunt et al., Biochem. Biophys. Res. Com. 214 (1995), 1175-1183), so daß N-terminales proBNP ebenfalls als Marker für Herzinsuffizienz in Frage kommt.

5

In der WO 93/24531 (US 5,786,163) wird ein immunologisches Verfahren zum Nachweis von N-terminalem proBNP und dazu verwendete Antikörper beschrieben. Zur Gewinnung der Antikörper werden hier einzelne synthetisch hergestellte Peptide aus der Sequenz von N-terminalem proBNP verwendet. Prinzipiell ist zwar die Gewinnung von 10 Antikörpern mittels Peptidimmunisierung möglich, doch ist die Affinität zum Gesamtpeptid im allgemeinen zu niedrig, um die erforderliche Sensitivität in einem Testverfahren zu erreichen. Darüberhinaus besteht die Gefahr, daß bei Verwendung von Peptiden Antikörper gewonnen werden, die beispielsweise den C-Terminus des Peptids erkennen und somit nur dieses Bruchstück des Gesamtpeptids binden können. Daraus 15 folgt, daß diese Antikörper das Gesamtpeptid nicht oder nur schwach binden können. In der WO 93/24531 werden polyklonale Antikörper gegen ein einziges vom N-terminalen proBNP abgeleitetes Peptid hergestellt. Es wird gezeigt, daß die erzeugten Antikörper zwar das Immunisierungspeptid (Aminosäuren 47-64) im kompetitiven Testformat binden. Es wird jedoch nicht gezeigt, daß die Antikörper in der Lage sind, 20 natives N-terminales proBNP als Gesamtpeptid in einer Probe zu binden. Der in der WO 93/24531 beschriebene Sandwichtest in einer Probe kann darüberhinaus nicht wie beschrieben durchgeführt werden, da kein geeignetes Standardmaterial zur Verfügung stand und keine Antikörper gegen zwei verschiedene Epitope vorgelegt haben.

25 Ein weiteres Problem im Stand der Technik ist die Sensitivität des Tests. Anhand des in der WO 93/24531 durchgeführten kompetitiven Tests, bei dem das Peptid 47-64 in markierter Form als Tracer mit einer Probe bzw. mit dem unmarkierten Peptid-Standard 47-64 um die Bindung an polyklonale Antikörper aus Kaninchenserum kompetieren, wird nach 48-stündiger Inkubation nur eine sehr mäßige Kompetition erreicht, aus der 30 bestenfalls eine untere Nachweisgrenze von etwa 250 fmol/ml abgeleitet werden kann. Dies ist weder für die Differenzierung von Gesunden und Patienten mit einer Herzinsuf-

fizienz, noch für eine differenzierte Klassifizierung von Patientenproben nach Schweregrad der Herzinsuffizienz ausreichend. Außerdem sind die langen Inkubationszeiten des kompetitiven Tests für routinemäßige Messungen der Proben im automatisierten Labor nicht akzeptabel.

5

Von Hunt et al. (Clinical Endocrinology 47 (1997), 287-296) wird ebenfalls ein kompetitiver Test zum Nachweis von N-terminalem proBNP beschrieben. Hierzu muß die Plasmaprobe vor Vermessung aufwendig extrahiert werden, was die Gefahr birgt, daß der Analyt dabei zerstört wird und Fehlmessungen auftreten. Das hier verwendete

10 Antiserum wird analog zur WO 93/24531 durch Immunisierung mit einem synthetischen Peptid erzeugt. Bei Hunt et al. wird das Antiserum durch Immunisierung mit den N-terminalen proBNP-Aminosäuren 1-13 erzeugt, als Standard wird das Peptid von Aminosäure 1-21 eingesetzt. Auch in diesem Test muß eine lange Inkubationszeit in Kauf genommen werden. Nach 24-stündiger Inkubation wird eine untere Nachweis-
15 grenze von 1,3 fmol/ml erreicht.

Im Stand der Technik existiert somit kein Verfahren zum Nachweis von N-terminalem proBNP, das bei kurzen Inkubationsdauern einen zuverlässigen, sensitiven Nachweis von nativem N-terminalem proBNP ermöglicht.

20

Aufgabe war es daher, ein Verfahren zum Nachweis von N-terminalem proBNP in einer Probe bereitzustellen, das die aufgeführten Nachteile des Standes der Technik weitestgehend vermeidet. Insbesondere sollte eine hohe Sensitivität im Test erreicht werden können, damit eine Differenzierung der Patientenproben von Gesunden und
25 Proben von Patienten der NYHA-Klassen I bis IV erfolgen kann.

Die Aufgabe wird gelöst durch das in den Ansprüchen näher definierte Verfahren zum Nachweis von N-terminalem proBNP in einer Probe. Das Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß mindestens zwei Antikörper, die verschiedene Epitope des N-terminalen proBNP erkennen, verwendet werden.

30

Das wesentliche am erfindungsgemäßen Verfahren ist, daß natives N-terminales proBNP in einer Probe erfasst wird. Das heißt, die Antikörper müssen in der Lage sein, das intakte Molekül und möglichst auch proteolytisch angedaute Bruchstücke in einer Probe zu erkennen und spezifisch zu binden. Im Verfahren werden mindestens zwei

5 verschiedene Antikörper eingesetzt, die verschiedene Epitope des N-terminalen proBNP binden. Die Epitope können linear oder sogenannte Konformationsepitope sein.

Bevorzugt sind die Epitope so lokalisiert, daß beide Antikörper gleichzeitig binden können.

10 Unter dem Begriff "Epitop" wird erfindungsgemäß die Bindungsstelle auf einem immunologischen Bindepartner wie beispielsweise einem Antigen verstanden, an den ein Antikörper spezifisch bindet. Ein "Epitop" wird meist eindeutig durch 6 bis 8 Aminosäuren definiert. Der Bindepartner entspricht erfindungsgemäß dem N-terminalen proBNP beziehungsweise einer Teilsequenz davon. Das Epitop, an den der Antikörper 15 bindet, ist dann ein Teilbereich auf dem Bindepartner. Das Epitop kann in linearer Form oder als Konformationsepitop vorhanden sein.

Mittels der beiden Antikörper unterschiedlicher Spezifität ist es möglich, statt der kompetitiven, langwierigen Testführung des Standes der Technik ein schnelleres

20 Verfahren zum Nachweis des Analyten durchzuführen. Das erfindungsgemäße Nachweisverfahren kann mittels homogener oder heterogener Testführung erfolgen. Bevorzugt ist die heterogene Testführung und besonders bevorzugt das dem Fachmann geläufige Sandwich-Verfahren.

25 Bevorzugt wird ein solches Verfahren zur Bestimmung des N-terminalen proBNP in folgenden Schritten durchgeführt:

a) Umsetzen der Probe mit einem für N-terminales proBNP spezifischen ersten Antikörper, der eine mit einer Festphase bindefähige Gruppe trägt, über die die Bindung an eine Festphase erfolgen kann, oder Umsetzen der Probe mit einem für N-terminales 30 proBNP spezifischen ersten Antikörper, der bereits an eine Festphase gebunden ist,

b) Umsetzen dieser Lösung mit dem zweiten Antikörper, der ein anderes Epitop erkennt

als der erste Antikörper, und der eine Markierung trägt

c) Bindung des gebildeten Immunkomplexes an eine Festphase, wobei die Festphase bereits in Schritt a) vorhanden sein kann

d) Trennung der festen von der flüssigen Phase

5 e) Detektion der Markierung in einer oder beiden Phasen.

Bei quantitativer Bestimmung wird die gleiche Messung mit einer definierten Menge an N-terminalem proBNP als Standard durchgeführt und nach Bestimmung der Probe als Schritt f) ein Vergleich der Messwerte des Standards mit dem Wert der Probe und die

10 Quantifizierung durchgeführt.

Unter dem Begriff "Antikörper" werden im Sinne der Erfindung mono- oder polyklonale, chimäre oder humanisierte oder andere durch gentechnologische Modifikationen erhältlichen Antikörper sowie sämtliche dem Fachmann bekannten Fragmente wie

15 $F(ab')_2$, Fab' oder Fab -Fragmente verstanden. Lediglich die immunologische spezifische Bindefähigkeit an N-terminales proBNP muß gewährleistet sein.

Der erste für N-terminales proBNP spezifische Antikörper kann entweder direkt an die Festphase gebunden sein, oder die Bindung an die Festphase erfolgt indirekt über ein

20 spezifisches Bindungssystem. Die direkte Bindung dieses Antikörpers an die Festphase erfolgt nach dem Fachmann bekannten Methoden, beispielsweise adsorptiv. Wird die Bindung indirekt über ein spezifisches Bindungssystem durchgeführt, so ist der erste Antikörper ein Konjugat, das aus einem Antikörper gegen N-terminales proBNP und einem Reaktionspartner eines spezifischen Bindungssystems besteht. Unter einem spezi-

25 fischen Bindungssystem werden hier zwei Partner verstanden, die spezifisch miteinander reagieren können. Das Bindungsvermögen kann dabei auf einer immunologischen Reaktion oder auf einer anderen spezifischen Reaktion beruhen. Bevorzugt wird als spezifisches Bindungssystem eine Kombination von Biotin und Avidin oder Biotin und Streptavidin verwendet. Weitere bevorzugte Kombinationen sind Biotin und Antibiotin, 30 Hapten und Anti-Hapten, Fc-Fragment eines Antikörpers und Antikörper gegen dieses

Fc-Fragment oder Kohlenhydrat und Lectin. Einer der Reaktionspartner des spezifischen Bindungssystems ist dann Teil des Konjugates.

Der andere Reaktionspartner des spezifischen Bindungssystems für den ersten Bindepartner liegt als Beschichtung der festen Phase vor. Bevorzugt wird hier Streptavidin

5 oder Avidin verwendet. Die Bindung des anderen Reaktionspartners des spezifischen Bindungssystems an ein unlösliches Trägermaterial kann nach den üblichen, dem Fachmann bekannten Methoden vorgenommen werden. Hierbei ist sowohl eine kovalente als auch eine adsorptive Bindung geeignet.

10

Als Festphase geeignet sind Reagenzgläschchen oder Mikrotiterplatten aus Polystyrol oder ähnlichen Kunststoffen, die an der Innenoberfläche mit einem Reaktionspartner des spezifischen Bindungssystems beschichtet sind. Weiterhin geeignet und besonders bevorzugt sind teilchenförmige Substanzen, wie beispielsweise Latexpartikel, magnetische

15 Partikel, Molekularsiebmaterialien, Glaskörperchen, Kunststoffschläuche und dergleichen. Auch poröse, schichtförmige Träger wie Papier oder Nitrocellulose können als Träger verwendet werden. Besonders bevorzugt werden magnetische Kugelchen, sogenannte Beads verwendet, die wiederum mit dem entsprechenden Bindepartner des oben beschriebenen spezifischen Bindesystems beschichtet sind. Diese Mikropartikel
20 können dann nach Ablauf der Testreaktion für die Durchführung der Nachweisreaktion beispielsweise durch Filtration, Zentrifugation oder im Falle der magnetischen Partikel durch einen Magneten von der flüssigen Phase getrennt werden.

Der zweite spezifische Antikörper erkennt ein anderes Epitop des N-terminalen proBNP
25 als der erste Antikörper. Der Abstand der beiden Epitope auf dem Molekül muß so groß sein, daß die gleichzeitige Bindung der beiden Antikörper an das N-terminale proBNP ohne Einschränkung möglich ist, da ansonsten kein Sandwich-Komplex gebildet werden kann.

30 Die Detektion der spezifischen Bindereaktionen zwischen den Antikörpern gegen N-terminales proBNP und N-terminalem proBNP kann auf verschiedene Weise erfolgen. Im

allgemeinen ist der zweite Antikörper markiert. Übliche Markierungen sind Chromogene, Fluorophore, zur Chemi- oder Elektrochemilumineszenz fähige Substanzen,

Radioisotope, Haptene. Enzymmarkierungen oder Substanzen, die wiederum ein spezifisches Bindungspaar bilden können wie beispielsweise Biotin/Streptavidin. Der Nach-

5 weis des Immunkomplexes erfolgt dann anhand des Signals, das von der Markierung ausgesandt wird. Beispielsweise kann der zweite Antikörper mit dem Hapten Digoxigenin markiert sein. Dieses Hapten wird wiederum von einem weiteren, für Digoxigenin spezifischen Antikörper gebunden. Der für Digoxigenin spezifische Antikörper ist selbst beispielsweise mit einem Enzym wie Peroxidase markiert. Der letztendliche Nachweis

10 erfolgt dann anhand der bei der Umsetzung der Peroxidase mit einem entsprechenden Substrat erfolgenden Farb- bzw. Extinktionsänderung.

Als Proben für die Durchführung des Verfahrens zum Nachweis von N-terminalem proBNP können alle dem Fachmann geläufigen biologischen Flüssigkeiten verwendet

15 werden. Bevorzugt werden als Probe Körperflüssigkeiten wie Vollblut, Blutserum, Blutplasma, Urin oder Speichel. besonders bevorzugt wird Blutserum und –plasma eingesetzt.

Neben den sogenannten Naßtesten, bei denen die Testreagenzien in flüssiger Phase

20 vorliegen, können auch alle gängigen Trockentestformate, die zum Nachweis von Antigenen, Haptenen, Peptiden, Proteinen, Antikörpern etc. geeignet sind, verwendet werden. Bei diesen Trockentests oder Teststreifen, wie sie beispielsweise in der EP-A-0 186 799 beschrieben sind, sind im allgemeinen alle Testkomponenten bis auf die zu untersuchende Probe auf einem Träger aufgebracht. Die Nachweisreaktion erfolgt, wenn 25 der Teststreifen mit der flüssigen Probe in Kontakt gebracht wird.

Das erfindungsgemäße Verfahren zeichnet sich dadurch aus, daß die untere Nachweisgrenze für N-terminales proBNP unter 1 fmol/ml liegt (entspricht 1 pmol/l). Die erfindungsgemäß hohe Sensitivität von < 1 fmol/ml wird ohne lange Inkubationszeiten

30 erreicht. Insgesamt liegt die Dauer des Verfahrens bei einem Mikrotiterplattentest unter 2 Stunden, bevorzugt mit sensitiveren Nachweismethoden wie der

Electrochemilumineszenz bei 15 Minuten. Eine Obergrenze für das Nachweisverfahren bezüglich der nachzuweisenden Konzentration existiert praktisch nicht. Die technologische Obergrenze wird im allgemeinen durch die verwendete Meßmethode vorgegeben. Das Verfahren weist prinzipiell auch sehr hohe Konzentrationen an N-terminalem proBNP nach.

Ein weiterer Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens ist die gute Differenzierung der Proben von Patienten mit und ohne Herzinsuffizienz anhand der erhaltenen Messwerte. Das Nachweisverfahren ist so sensitiv, daß sogar eine Differenzierung zwischen

10 Patienten ohne koronarer Erkrankung und Patienten mit einer nur schwach ausgeprägten oder langsam einsetzenden Herzinsuffizienz der NYHA-Klassen I und II erfolgen kann. Eine solch frühe Erkennung einer einsetzenden Herzinsuffizienz kann die Entscheidung zu einer frühzeitigen medikamentösen Behandlung beeinflussen und somit die Überlebensrate des Patienten deutlich verlängern.

15

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist rekombinant hergestelltes N-terminales proBNP. Unter N-terminalem proBNP wird der vom 108 Aminosäuren großen Vorläufermolekül proBNP abgespaltene N-terminale Teil verstanden, der aus den Aminosäuren 1-76 besteht. Unter N-terminalem proBNP werden auch Teile davon 20 verstanden, die aufgrund von Abbaureaktionen dieses Moleküls im Blut vorkommen können

Im Stand der Technik ist bisher kein rekombinantes N-terminales proBNP bekannt, da dessen Herstellung aufgrund der kurzen Aminosäuresequenz nicht leicht möglich ist. Die 25 chemische Synthese eines über 30 Aminosäuren großen Peptids ist aufgrund der auftretenden Fehlsequenzen und der stark abnehmenden Ausbeute pro Synthesezyklus keine Alternative zur rekombinanten Herstellung in einem Wirtsorganismus.

Für ein diagnostisches Nachweisverfahren wird jedoch immer ein Standard- oder

30 Kontrollmaterial benötigt, mit dessen Hilfe zum einen die Bestimmung des Analyten quantitativ erfolgen kann und zum anderen die Funktionsfähigkeit des Tests überprüft

werden kann.. Soll eine Quantifizierung erfolgen, so muß mittels einer Standardreihe eine definierte quantitative Eichung vorgenommen werden. Eine solche Eichung ist wiederum auch nur dann sinnvoll, wenn das als Standard verwendete Material sich im immunologischen Test gleich oder sehr ähnlich verhält wie der Analyt. Wesentlich dabei

5 ist, daß der Standard eine ausreichend große strukturelle und insbesondere immuno-
logische Ähnlichkeit zum Analyten besitzt, damit die Bindung des Standards an die
Nachweisantikörper so erfolgt, wie sie dann auch beim nativen Molekül in der Probe
stattfindet.

10 Ein solches Standardmaterial für ein Verfahren zum Nachweis von N-terminalem
proBNP steht im Stand der Technik nicht zur Verfügung. Lediglich kurze synthetische
Peptide werden beschrieben. Erfundungsgemäß ist es nun erstmals möglich gewesen, mit
Hilfe der Gensynthese eine für N-terminales proBNP codierende DNA-Sequenz herzu-
stellen und anschließend eine rekombinante Expression des N-terminalen proBNP in E.
15 coli zu erreichen. Die Vorgehensweise ist in Beispiel 1 erläutert.

Gegenstand der Erfindung ist daher die Verwendung von rekombinantem N-terminalen
proBNP als Standard in einem Verfahren zum Nachweis von N-terminalem proBNP in
einer Probe mittels mindestens zweier Antikörper, die verschiedene Epitope des N-
20 terminalen proBNP erkennen.

Für Immunisierungszwecke wurden im Stand der Technik bislang ebenfalls nur
synthetische, vom N-terminalen proBNP abgeleitete kurze Peptide eingesetzt. Der
Nachteil bei Peptidimmunisierungen ist, daß meist nur sehr niedrig affine Antikörper
25 erhalten werden bzw. die gewonnenen Antikörper nur mit linearen Epitopen reagieren
und das nativ gefaltete Antigen in der Probe nicht gebunden werden kann (siehe Beispiel
3).

Deshalb ist es wichtig, für Immunisierungen zur Herstellung von Antikörpern ein
30 Immunogen zu verwenden, das zum letztendlich nachzuweisenden Analyten eine

genügend große Ähnlichkeit aufweist. Nur so ist gewährleistet, daß von den Antikörpern der native Analyt in der Probe mit hoher Affinität gebunden wird.

Ein Gegenstand der Erfindung ist daher auch die Verwendung von rekombinantem N-terminalem proBNP als Immunogen zur Herstellung von Antikörpern gegen N-terminales proBNP.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Antikörper gegen rekombinantes N-terminales proBNP. Die Definition des Begriffes Antikörper entspricht der Definition in den Abschnitten über die Testführung. Die erfindungsgemäßen Antikörper erkennen bevorzugt spezifisch Epitope im N-terminalen Teil des 76 Aminosäuren großen N-terminalen proBNP, dabei bevorzugt im Bereich von Aminosäure 10 bis 66, besonders bevorzugt im Bereich von Aminosäure 10 bis 38. Sinnvoll ist es, wenn die von den Antikörpern erkannten Epitope so lokalisiert sind, daß auch N-terminales proBNP, das in einer Probe bereits von den Enden her proteolytisch angedaut ist, diese Epitope noch enthält. Somit ist die Stabilität des Analyten in der Probe eher zweitrangig. Die Epitope in den bevorzugten Bereichen des N-terminalen proBNP können linear oder als Konformationsepitope vorliegen.

Ein bevorzugter Gegenstand der Erfindung sind daher monoklonale Antikörper, die von den Zelllinien MAK M 10.1.11 und MAK M 13.4.14, hinterlegt und eingegangen am 26.01.1999 bei der DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland, produziert werden. Bei den Antikörpern, die von diesen beiden Zelllinien produziert werden, handelt es sich um Antikörper vom IgG-Typ.

Die Zelllinien M 10.1.11 und M 13.4.14 sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung.

Ebenfalls ein Gegenstand der Erfindung sind Antikörper, die in äquivalenter Weise wie die von den Zelllinien M 10.1.11 und M 13.4.14 produzierten mit N-terminalem proBNP spezifisch bindefähig sind. Unter dem Begriff "in äquivalenter Weise produzierte" Antikörper wird verstanden, daß die Antikörper durch Immunisierung mit rekombinantem N-terminalem pro-BNP gewonnen werden.

Gegenstand der Erfindung sind auch Verfahren zur Herstellung von Antikörpern, die spezifisch N-terminales proBNP binden.

5 Die Herstellung von polyklonalen Antikörpern erfolgt bevorzugt mit den Schritten Immunisieren eines geeigneten Organismus wie beispielsweise Schafe mit rekombinant hergestelltem N-terminalem proBNP, Isolieren der Antikörper, Screenen nach den reaktivsten Epitopen und Aufreinigung der Antikörper über Immunsorption an geeigneten Peptiden. Ein solches Verfahren ist in Beispiel 2 beschrieben.

10

Die Herstellung von monoklonalen Antikörpern erfolgt bevorzugt mit den Schritten Immunisieren eines geeigneten Organismus wie beispielsweise Mäuse mit rekombinant hergestelltem N-terminalem proBNP und Auswahl der Klone bezüglich der Reaktivität der Antikörper mit nativem N-terminalem proBNP in verschiedenen Pools von Patienten-15 tsernen. Ein solches Verfahren ist in Beispiel 3 beschrieben.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung weiter.

Beispiel 1**Verfahren zur Herstellung von rekombinantem N-terminalen proBNP (1-76)****1. Klonierung des rekombinanten N-terminalen proBNPs**

5

Die Nukleotidsequenz des N-terminalen ProBNPs (Aminosäuresequenz 1-76) wurde mit Hilfe der Gensynthese hergestellt. Um eine in *E. coli* optimale Expression des Gens zu erreichen, wurde die DNA-Sequenz auf die in *E. coli* am häufigsten verwendeten Codons abgestimmt. Die Sequenzen der Oligonukleotide, die zur Herstellung des Gens verwendet

10 wurden lautet wie folgt:

Pro5' (SEQ ID NO 1):

5'CCGGATCCCACCCGCTG3'

15 Pro1hum (SEQ ID NO 2):

5'CGGGATCCCACCCGCTGGTCCCCGGGTTCCGCTTCCGACCTGGAAACCT
CCGGTCTGCAGGAACAGCGTAACCACCT3'

Pro2hum (SEQ ID NO 3):

20 5'CGGTTCCAGGGAGGTCTGTTAACCTGCAGTCGGACAGTTACCCTGCAG
GTGGTTACGCTGTTCTGC3'

Pro3hum (SEQ ID NO 4):

5'CAGACCTCCCTGGAACCGCTGCAGGAATCCCCGCGTCCGACCGGTGTTGG
25 AAATCCCGTGAAGTTGCTAC 3'

Pro4hum (SEQ ID NO 5):

5'CCCAAGCTTAACGCGGAGCACGCAGGGTGTACAGAACCAACCGTGA
CCACGGATACTTCGGTAGCAACTTCACGGGATTCC3'

30

Pro3' (SEQ ID NO 6):

5'CCCAAGCTTAACGCGGAGC3'

Die Herstellung des Gens erfolgte mit diesen Primern mit Hilfe der PCR (polymerase chain reaction). Das amplifizierte Gen wurde in einen geeigneten Vektor wie z.B. den Vektor pUC19 kloniert und sequenziert. Zur Klonierung des Gens in den Expressions-

5 vektor pQE8 wurde das Gen über die Restriktionsschnittstellen *Bam* HI und *Hind* III aus dem Vektor pUC19 herausgeschnitten, in den Vektor pQE8 ligiert, der eine Expression von Proteinen mit N-terminalem Histidin-Tag erlaubt, und in *E. coli* M15 [pREP4] transformiert.

10 2. Expression des N-terminalen ProBNPs in *E. coli*

Zur Expression des Gens in *E. coli* wurde eine Übernachtkultur eines rekombinanten *E. coli* Klons 1/60 in Luria-Broth (mit 100 µg/ml Ampicillin und 50 µg/ml Kanamycin) überimpft und bei einer OD 550 von 1 mit IPTG (Isopropylthiogalactosid; 1 mM End-15 konzentration) induziert. Nach der Induktion wurden die Kulturen noch weitere 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Kulturen wurden abzentrifugiert und das Zellpellet in 50 mM Na-Phosphatpuffer, pH 8,0; 300 mM NaCl aufgenommen. Nach Aufschluss der Zellsuspension durch Ultraschall, wurde die Suspension abzentrifugiert und der Überstand auf eine Ni-NTA (Nitrilo-triacetat) Säule aufgetragen. Nach einem Waschschritt 20 mit 50 mM Na-Phosphatpuffer, pH 8,0; 300 mM NaCl; 20 mM Imidazol wurde das Histidin-getaggte N-terminale proBNP eluiert mit 50 mM Na-Phosphatpuffer, pH 8,0; 300 mM NaCl; 300 mM Imidazol. Die eluierten Fraktionen wurden vereinigt und gegen 50 mM Tris pH 8,0 dialysiert. Zur Abtrennung von Verunreinigungen wurde das Dialysat 25 auf eine Q-Sepharosesäule aufgetragen. Die Masse des aufgereinigten N-terminalen proBNPs wurde über MALDI-TOF bestimmt.

Beispiel 2**Herstellung von polyklonalen Antikörpern gegen N-terminales pro-BNP**1. Immunisierung

5

Schafe wurden mit rekombinantem N-terminalem proBNP(1-76) in kompletten Freund'schem Adjuvans immunisiert. Die Dosis betrug 0,1 mg je Tier. Die Immunisierungen wurden über 10 Monate im Abstand von 4 Wochen wiederholt. 6 Wochen nach der ersten Immunisierung und danach monatlich einmal wurden Serumproben 10 gewonnen und auf Sensitivität und Titer untersucht.

2. Aufreinigung von polyklonalen Antikörpern aus Schafserum

Aus dem Rohserum eines mit rekombinantem N-terminalem proBNP immunisierten 15 Schafs wurden Lipidbestandteile durch Delipidierung mit Aerosil (1,5%) entfernt. Danach wurden die Immunglobuline mit Ammoniumsulfat (2M) ausgefällt. Der gelöste Niederschlag wurde gegen 15mM KPO₄, 50mM NaCl pH 7,0 dialysiert und über DEAE-Sepharose chromatographiert. Die IgG-Fraktion, PAK<rec. NT-pro-BNP>S-IgG(DE), befand sich im Durchlauf.

20

3. Sequenzielle Affinitätschromatographie zur Herstellung von NT-pro-BNP spezifischen polyklonalen Antikörpern

Für die Aufreinigung von NT-proBNP spezifischen, gegen die Aminosäuren 1-21 25 gerichteten polyklonalen Antikörpern, PAK<rec. NT-pro-BNP>M-IgG(IS,1-21), wurde das C-terminal biotinylierte Peptid HPLGSPGSASDLETSGLQEQR-Bi (1-21-Bi, SEQ ID NO 7) verwendet. Die Affinitätsmatrix wurde durch Beladen von 10ml Streptavidin beschichteten Methacrylatpolymer-Partikeln (Boehringer Mannheim, Best. Nr. 1529188) mit 1mg Peptid (1-21-Bi) hergestellt.

30

Mit 10ml der Affinitätsmatrix wurde eine Säule gepackt und mit 50mM KPO₄, 150mM NaCl pH 7,5 (PBS) äquilibriert. Für den ersten Schritt der sequenziellen Affinitätschromatographie wurden 850mg PAK<NT-pro-BNP>S-IgG(DE) auf die Säule aufgezogen. Der Durchlauf wurde für einen zweiten Schritt (siehe unten) aufgehoben. Die

5 Säule wurde mit PBS und 20mM KPO₄, 500mM NaCl, 0,1% Triton X-100, 0,5% Na-Deoxicholsäure pH 7,5 gewaschen. Das spezifisch an die Affinitätsmatrix gebundene IgG wurde mit ImmunoPure[®] Gentle Ag/Ab Elution Buffer (Pierce, Product #: 21013) eluiert. Die Affinitätsmatrix wurde mit 1M Propionsäure regeneriert und in PBS/NaN₃ gelagert.

10 Auf die gleiche Art und Weise wie oben beschrieben, wurde das Peptid ELQVEQTS-L-Bi (30-38-Bi, SEQ ID NO 8) für die Herstellung einer Affinitätsmatrix zur Aufreinigung von NT-pro-BNP spezifischen, gegen die Aminosäuren 30-38 gerichteten Immunoglobulinen verwendet. PAK<rec. NT-pro-BNP>M-IgG(IS,30-38) wurde aus dem Durchlauf der ersten Affinitätsreinigung gewonnen.

15

4. Biotinylierung von PAK<NT-pro-BNP>S-IgG(IS,1-21)

Die affinitätsgereinigten Antikörper werden gegen den Biotinylierungspuffer (100mM KPO₄, 70mM NaCl pH 8,0) dialysiert und anschließend wird die Lösung auf eine

20 Proteinkonzentration von 1mg/ml eingestellt. D-Biotinoyl-Aminocapronsäure-N-Hydroxysuccinimidester wird in DMSO gelöst und in einem molaren Verhältnis von 1:7,5 der Antikörperlösung beigemischt. Die Reaktion wird durch Zugabe von L-Lysin gestoppt und das überschüssige Markierungsreagenz wird durch Dialyse entfernt.

25 5. Digoxigenylierung von PAK<NT-pro-BNP>S-IgG(IS,30-38)

Die affinitätsgereinigten Antikörper werden gegen den Digoxigenylierungspuffer (100mM KPO₄, 70mM NaCl pH 7,6) dialysiert und anschließend wird die Lösung auf eine Proteinkonzentration von 1mg/ml eingestellt. Digoxigenin-3-CME-N-Hydroxy-

30 succinimidester wird in DMSO gelöst und in einem molaren Verhältnis von 1:5 der

Antikörperlösung beigemischt. Die Reaktion wird durch Zugabe von L-Lysin gestoppt und das überschüssige Markierungsreagenz wird durch Dialyse entfernt.

5 Beispiel 3

Herstellung und Screening nach monoklonalen Antikörpern gegen N-terminales proBNP (1-76)

1. Gewinnung von monoklonalen Antikörpern gegen NT-pro-BNP(1-76)

10

Balb/c-Mäuse, 8-12 Wochen alt, werden mit 100 µg rekombinantem N-terminalem proBNP-Antigen, mit komplettem Freundschen Adjuvans, intraperitoneal immunisiert. Nach 6 Wochen werden drei weitere Immunisierungen in 4 wöchigem Abstand durchgeführt. Eine Woche nach der letzten Immunisierung erfolgt eine Blutabnahme und 15 die Bestimmung des Antikörpertiters im Serum der Versuchstiere. Aus positiv reagierenden Mäusen werden aus der Milz dieser Tiere die B-Lymphozyten gewonnen, die mit einer permanenten Myelomzelllinie fusioniert werden. Die Fusionierung erfolgt nach dem bekannten Verfahren von Köhler und Millstein (Nature 256, 1975, S. 495 – 497). Die hierbei gebildeten Primärkulturen von Hybridzellen werden in üblicher Weise, 20 z.B. unter Verwendung eines handelsüblichen Zellsorters oder durch "limiting dilution" kloniert. Es werden nur die Klonkulturen weiterverarbeitet, die in einem geeigneten Testverfahren, beispielsweise einem Enzym-Immuno-Assay (ELISA-Verfahren), positiv mit rekombinantem N-terminalem proBNP reagieren und natürliches N-terminales proBNP in Patientenserien erkennen (siehe Punkt 2.). Man erhält so mehrere Hybridoma- 25 Zelllinien, die die erfundungsgemäßen monoklonalen Antikörper produzieren.

Zur Erzeugung von Aszites werden 5×10^6 Hybridomzellen intraperitoneal in Balb/c Mäuse gespritzt, die zuvor 1-2 mal mit 0,5 ml Pristan vorbehandelt worden sind. Nach 2-3 Wochen kann aus dem Bauchraum der Mäuse Aszites-Flüssigkeit gewonnen werden. 30 Hieraus können in üblicher Weise die Antikörper isoliert werden. Diese monoklonalen Antikörper sind spezifisch gegen humanes N-terminales proBNP gerichtet. Sie werden

im folgenden MAK M 10.1.11 bzw. MAK M 13.4.14 bezeichnet. Die beiden monoklonalen Antikörper gehören der Subklasse IgG1, kappa an.

Auf diese Weise konnten die beiden Hybridoma-Zelllinien Klon M 10.1.11 und M 13.4.14

5 isoliert werden, die bei der DSMZ, wie oben erwähnt, hinterlegt wurden.

2. Screening-Test auf Antikörper gegen pro-BNP-Peptide und rekombinantes NT-pro-BNP

10 Um die Anwesenheit und Spezifität von Antikörpern gegen NT-proBNP im Serum immunisierter Mäuse, im Kulturüberstand der Hybridzellen oder in Aszitesflüssigkeit zu erkennen, wurden die Klone mit folgenden Testprinzipien bewertet:

a) Reaktivität mit rekombinantem N-terminalem proBNP

15 Mikrotiterplatten (Fa. Nunc, Maxisorb) werden mit 2,5 µg/ml rekombinantem NT-pro-BNP als Antigen in Beladungspuffer (Fa. Boehringer, 0,2 M Natriumcarbonat/-Bicarbonat, pH 9,3-9,5, Cat. No. 726 559) 100 µl/well, 1 Stunde bei Raumtemperatur unter Schütteln, gebunden. Die Nachbeladung erfolgt in PBS-Puffer (Phosphate Buffered Saline, Fa. Oxid, Code-BR 14a) und 1% Byco C, 30 Minuten. Anschließend wird mit Waschpuffer gewaschen (0,9 Natriumchlorid-Lösung, 0,05% Tween 20). Die Antikörperprobeninkubation erfolgt mit 100 µl/well, 1 Stunde bei Raumtemperatur unter Schütteln. Dann wird erneut zweimal mit Waschlösung gewaschen. Dann erfolgt eine weitere Inkubation mit dem Nachweisantikörper PAK<math>\text{M-Fc}\gamma>\text{S-Fab-Peroxidasekonjugates (Boehringer Mannheim, Kat. Nr. 1500 686), 100 mU/ml, 100 }\mu\text{l/well, 1 Stunde bei Raumtemperatur unter Schütteln. Nach einem erneuten Waschschritt mit Waschpuffer wird die Peroxidaseaktivität in üblicher Weise bestimmt (beispielsweise mit ABTS*), 30 Minuten bei Raumtemperatur, abgelesen wird die Extinktionsdifferenz in mE, bei 405 nm mittels eines ELISA-Readers.}

20

b) Reaktivität mit N-terminalen proBNP-Peptiden:

In diesem Fall werden Streptavidin-beladene Mikrotiterplatten mit NT-pro-BNP-Peptid-Biotinkonjugaten der Sequenzen 1-10, 8-18, 1-21, 16-30, 30-38, 39-50, 50-63 oder 64-76 als Antigen, 250 ng/ml in PBS-Puffer (Phosphate Buffered Saline, Fa. Oxid, Code-BR

5 14a) mit 0,5 % Byco C, 100 µl/well, 1 Stunde bei Raumtemperatur unter Schütteln, gebunden. Anschließend wird mit Waschpuffer gewaschen (0,9 Natriumchlorid-Lösung, 0,05% Tween 20). Die Antikörperprobeninkubation und die Nachweisreaktion erfolgt wie unter a) beschrieben. Aufgrund der Reaktivität mit bestimmten NT-pro-BNP-Peptiden kann die Lage des Epitops erfaßt werden.

10

c) Reaktivität mit nativem N-terminalem proBNP in der Patientenprobe

Mikrotiterplatten (Fa. Nunc, Maxisorb) werden mit 5 µg/ml PAK<human pro-BNP>S-IgG (IS,(1-21) bzw. (30-38)S-IgG in Beschichtungspuffer(Fa. Boehringer, 0,2 M

15 Natriumcarbonat-/Bicarbonat, pH 9,3 -9,5, Cat. No. 728 559) 100 µl/well, 1 Stunde bei Raumtemperatur unter Schütteln, gebunden. Die Nachbeladung erfolgt in PBS-Puffer (Phosphate Buffered Saline, Fa. Oxid, Code-BR 14a) und 1% Byco C, 30 Minuten. Anschließend wird mit Waschpuffer gewaschen (0,9 Natriumchlorid-Lösung, 0,05% Tween 20). Die Inkubation mit nativem Antigen in Patientenplasma, verdünnt in PBS-
20 Puffer,erfolgt mit 100 µl/well, 1 Stunde bei Raumtemperatur unter Schütteln. Nach einem erneuten Waschschnitt erfolgt die Antikörper-probeninkubation mit 100 µl/well, 1 Stunde bei Raumtemperatur unter Schütteln. Dann wird erneut zweimal mit Waschlösung gewaschen und es erfolgt eine weitere Inkubation mit dem Nachweisantikörper PAK<M-Fcγ>S-Fab-Peroxidase-konjugates (Boehringer Mannheim GmbH, Kat. Nr. 25 1500 686), 100 mU/ml, 100 µl/well, 1 Stunde bei Raumtemperatur unter Schütteln. Nach einem erneuten Waschschnitt mit Waschpuffer wird die Peroxidaseaktivität in üblicher Weise bestimmt (beispielsweise mit ABTS[®], 30 Minuten bei Raumtemperatur, abgelesen wird die Extinktionsdifferenz in mE, bei 405 nm mittels eines ELISA-Readers).

30

3. Ergebnisse: Reaktionsmuster der monoklonalen und polyklonalen Antikörper gegen N-terminales proBNP

a) Reaktivität der MAKs ($c = 5 \mu\text{g/ml}$) aus Immunisierung mit N-terminalen proBNP-Peptiden:

5 Tabelle 1:

MAK	Immu-nogen	Reaktivität mit Pro-BNP-Peptiden								Rec. pro-BNP	Natives pro-BNP
		1-10	8-18	1-21	16-30	30-38	39-50	50-63	64-76		
5.2.27	1-10	1.42	0.04	1.48	0.05	0.03	0.04	0.04	0.04	1.16	0.30
2.1.4	16-30	0.04	0.04	0.04	1.86	0.04	0.04	0.04	0.04	0.1	0.02
1.2.6	39-50	0.04	0.04	0.03	0.04	0.03	1.23	0.03	0.04	0.44	0.06

Die monoklonalen Antikörper, die aus Immunisierungen mit unterschiedlichen Peptiden erhalten wurden, reagieren sehr stark mit den jeweiligen Peptiden. Die Reaktivität mit 10 dem rekombinanten N-terminalen proBNP ist nur bei 2 monoklonalen Antikörpern zu erkennen, während mit nativem N-terminalen proBNP in einem Patientenpool keine Reaktion erfolgt (siehe Tabelle 1).

15 b) Reaktivität der monoklonalen Antikörper (MAK) aus Immunisierung mit rekombinantem N-terminalem proBNP:

Tabelle 2:

MAK	Reaktivität mit Pro-BNP-Peptiden								Rec. pro-BNP	Natives proBNP
	1-10	8-18	1-21	16-30	30-38	39-50	50-63	64-76		
10.1.11	0.04	0.97	1.03	0.04	0.04	0.06	0.04	0.04	1.61	1.70
10.3.19	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.05	0.04	0.03	1.24	0.91
10.3.30	0.04	0.04	0.03	0.04	0.04	0.06	0.04	0.03	1.43	0.79
13.4.14	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.05	0.03	0.04	1.65	1.83
13.1.18	0.04	0.04	0.03	0.04	1.14	0.03	0.04	0.04	1.47	0.56
13.2.22	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.03	0.04	0.04	1.82	1.61

20 Die monoklonalen Antikörper aus der Immunisierung mit rekombinantem N-terminalen proBNP reagieren nur vereinzelt mit Peptiden, aber sehr stark mit rekombinantem N-terminalen proBNP bzw. mit nativem N-terminalen proBNP in einem Patientenpool. Die Nichtreaktion einzelner monoklonaler Antikörper mit den Peptiden deutet auf die Erkennung sogenannter Konformationsepitope hin (siehe Tabelle 2).

c) Reaktivität der PAKs aus Immunisierung mit rekombinantem N-terminalem proBNP:

Tabelle 3:

PAK	Immun-sorption	Reaktivität mit Pro-BNP-Peptiden								Rec. pro-BNP	Natives pro-BNP
		1-10	8-18	1-21	16-30	30-38	39-50	50-63	64-76		
S-9212	ohne	0.13	1.81	1.98	1.16	2.99	0.83	1.22	0.06	0.89	-
S-9212	1-21	0.99	2.99	2.99	1.00	0.20	0.13	0.20	0.15	1.98	1.41
S-9212	30-38	0.08	0.07	0.07	0.07	2.99	0.06	0.17	0.06	2.99	1.41

5

Der gewonnene PAK reagierte am stärksten mit den Peptiden 1-21 und 30-38. Aus diesem Grund wurden diese Epitope ausgewählt und der PAK mit Hilfe dieser Peptide positiv immunsorbiert. Der mit Peptid 1-21 immunsorbierte PAK reagiert am stärksten mit der Region 8-20 und deutlich abgeschwächt mit der N-terminalen Sequenz 1-10. Die 10 so immunsorbierten PAKs reagieren sehr stark mit dem rekombinanten N-terminalen proBNP und im PAK/PAK-Sandwichformat mit der nativen Probe (siehe Tabelle 3).

Beispiel 415 **Hochsensitiver Immunoassay zur Bestimmung von NT-pro-BNP**

Mit Hilfe der in Beispiel 2 und 3 gewonnenen Antikörper konnte ein hochsensitiver Immunoassay aufgebaut werden. Generell sind alle Testformate geeignet, bei denen 2 Antikörper mit unterschiedlicher Epitoperkennung eingesetzt werden. Als Beispiel wird 20 ein sogenannter Sandwich-ELISA beschrieben.

Als Festphase wurde eine mit Streptavidin beschichtete Mikrotiterplatte (MTP) verwendet. 10 µl unbehandelte Probe oder Kalibrator wird zusammen mit 100 µl Puffer, der die beiden epitop-spezifischen Antikörper enthält, in die MTP-Näpfe pipettiert und 1 25 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Als Antikörper wurden 1 µg/ml biotinylierter PAK<rec. NT-pro-BNP>S-IgG(IS,1-21) und 0.5 µg/ml digoxigenylierter PAK< rec. NT-pro-BNP>S-IgG(IS,30-38) eingesetzt. Anschließend wird die Lösung abgesaugt und 3x mit 350 µl Waschpuffer gewaschen. Danach werden 100 µl Konjugatösung

dazupipettiert und wiederum 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Als Konjugat wird ein Anti-Digoxin-Antikörper-POD-Konjugat in einer Konzentration von 100 mIU/ml verwendet. Anschließend wird die Konjugatlösung abgesaugt und 3x mit 350 µl Waschpuffer gewaschen. Zum Schluß wird ABTS[®]-Substratlösung in die Wells pipettiert 5 und 30 Minuten bei Raumtemperatur gemessen. Nach Erreichen der 30-minütigen Substratreaktion wird die Mikrotiterplatte sofort in einem MTP-Reader bei einer Wellenlänge von 405 nm gegen die Referenzwellenlänge von 495 nm vermessen.

10 Zur Bestimmung der Sensitivität wurde eine Eichkurve erstellt und die Präzision des Nullstandards ($n = 21$) bestimmt. Als Kalibratoren wurde humanes EDTA-Plasma verwendet, welches mit rekombinantem N-terminalen proBNP in der erforderlichen Konzentration aufgestockt wurde. Als Nullstandard wurde Rinderplasma verwendet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 dargestellt.

15 Tabelle 4:

	Extinktion (Mittelwert)	Standardabweichung ($n = 21$)
Kalibrator a: 0 fmol/ml	131 mE	5.7 mE
Kalibrator b: 5.04 fmol/ml	268 mE	
Kalibrator c: 19.9 fmol/ml	746 mE	
Kalibrator d: 50.5 fmol/ml	1500 mE	
Kalibrator e: 100.9 fmol/ml	2401 mE	

Anhand der Eichkurvensteilheit von 22.5 mE x ml/fmol und einem SD von 5,7 mE ergibt sich nach der Formel von Kaiser folgende untere Nachweisgrenze:

20 $UNG = 3 \cdot SD_{Nullstandard}/Ek\text{-steilheit} = 3 \times 5.7/22.5 = 0.76 \text{ fmol/ml.}$

Beispiel 5**Ermittlung der Probenstabilität von N-terminalem proBNP**

Mit Hilfe des in Beispiel 4 beschriebenen Sandwich-ELISA wurde die Analytstabilität von N-terminalem proBNP vermessen. Dazu wurden 4 Patienten mit NYHA-Klasse II-III Blut in EDTA-haltigen Abnahmeröhrchen abgenommen und bei Raumtemperatur über 3 Tage aufbewahrt. Jeden Tag wurde eine Probe entnommen und der Gehalt an N-terminalem proBNP vermessen. Die Referenzprobe sowie die Proben zur Stabilitäts-ermittlung in EDTA-Plasma wurden sofort auf 4°C - 8°C abgekühlt und innerhalb von 15 Minuten zentrifugiert. Die EDTA-Plasmen wurden bei 4°C und Raumtemperatur aufbewahrt und zu verschiedenen Zeitpunkten innerhalb einer 24-stündigen Belastungszeit vermessen. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5:

Belastungszeit	Wiederfindung (%)
EDTA-Vollblut, Raumtemperatur	24 h 98.8
	48 h 98.0
	72 h 100.5
EDTA-Plasma, 4°C	2 h 97.5
	4 h 98.5
	6 h 102.0
	24 h 103.0
EDTA-Plasma, Raumtemperatur	2 h 103.0
	4 h 104.8
	6 h 102.0
	24 h 96.0

15

Diese Daten belegen, daß N-terminales proBNP innerhalb der geprüften Zeitpunkte vollkommen stabil ist und somit als Routineparameter verwendbar ist. Dieses Ergebnis ist widersprüchlich zur Literatur (Hunt et. al., Clinical Endocrinology, 47, 287 (1997)) und bestätigt die Annahme, daß durch Auswahl und Design dieses Testformats mit 2 spezifischen Antikörpern, deren Epitope nicht am äußeren Ende des Analyten liegen, die Analytstabilität beeinflußt werden kann.

Beispiel 6**Ermittlung der diagnostischen Sensitivität des N-terminalen proBNP-Assays**

Zur Ermittlung der diagnostischen Sensitivität wurde wiederum der in Beispiel 4

5 beschriebene Test verwendet. Dazu wurden 114 Gesunde und 235 Patienten mit einer NYHA-Klassifizierung zwischen I und IV vermessen. Normalerweise ist es besonders kritisch, Gesunde von Patienten mit NYHA-Klasse I zu unterscheiden.

Mit diesem hochsensitiven Assay wurde bei den 110 gesunden Blutspendern ein

10 Medianwert von 6,6 fmol/ml NT-proBNP mit einer Standardabweichung von 7,3 fmol/ml ermittelt. Der niedrigste Wert wurde mit 0,2 fmol/ml ermittelt. Dies zeigt deutlich, daß eine Sensitivität $< 1,0$ fmol/ml notwendig ist, um den Referenzbereich genau zu erfassen. Mit Hilfe dieser Verteilung wurde der obere Normalwertbereich (97,5% Percentile) mit 26,6 fmol/ml ermittelt.

15

Unter Annahme des Referenzwertbereichs von 0 - 26,6 fmol/ml wurden von den 233 Patienten mit NYHA-Klassifizierung I-IV nur 16 Patienten mit einem Wert im Normalbereich ermittelt. Dies entspricht einer klinischen Sensitivität von 93,3%. Werden nur die Patienten mit einer NYHA-Klassifizierung von I betrachtet, dann werden 30 der 20 37 Patienten positiv erkannt, dies entspricht einer Sensitivität von 81,1 %.

Dieses Ergebnis bestätigt, daß durch diesen hochsensitiven N-terminalen proBNP-Assay

eine deutliche Differenzierung zwischen Patienten mit einer Herzinsuffizienz der NYHA-

Klasse I von gesundem Normalkollektiv unterscheidbar ist. Dies konnte mit den bisher

25 im Stand der Technik verfügbaren Assays (Dagubatti et al., Cardiovascular Research 36 (1997), 246 nicht erreicht werden.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweis von N-terminalem proBNP in einer Probe dadurch gekennzeichnet, daß mindestens zwei Antikörper, die verschiedene Epitope des N-terminalen proBNP erkennen, verwendet werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, daß die Antikörper gleichzeitig am N-terminalen proBNP binden können.
- 10 3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2 dadurch gekennzeichnet, daß das Verfahren als heterogenes Verfahren durchgeführt wird
4. Verfahren nach Anspruch 3 dadurch gekennzeichnet, daß das Verfahren im Sandwichformat durchgeführt wird
- 15 5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche dadurch gekennzeichnet, daß die untere Nachweisgrenze für N-terminales proBNP unter 1 fmol/ml liegt.
6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche dadurch gekennzeichnet, daß 20 mittels der erhaltenen Werte eine Differenzierung nach Proben von gesunden Patienten und Proben von Patienten mit Herzinsuffizienz der NYHA-Klassen I bis IV vorgenommen werden kann
7. Verfahren nach Anspruch 6 dadurch gekennzeichnet, daß anhand der erhaltenen 25 Werte eine Differenzierung zwischen Proben von gesunden Patienten und Proben von Patienten der NYHA-Klasse I vorgenommen werden kann.
8. Verwendung des Verfahrens gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche zur Differenzierung zwischen Proben von gesunden Patienten und Proben von Patienten 30 der NYHA-Klassen I bis IV

9. Rekombinantes N-terminales proBNP
10. Verwendung von rekombinantem N-terminalen proBNP als Standard in einem Verfahren zum Nachweis von N-terminalem proBNP gemäß den Ansprüchen 1 bis 7.
- 5
11. Verwendung von rekombinantem N-terminalen proBNP zur Herstellung von Antikörpern gegen N-terminales proBNP.
- 10
12. Antikörper gegen rekombinantes N-terminales proBNP.
13. Antikörper gemäß Anspruch 12 dadurch gekennzeichnet, daß sie im Bereich von Aminosäure 10 bis 66 des N-terminalen proBNP spezifisch binden.
14. Antikörper gemäß Anspruch 12 oder 13 erhältlich durch Immunisierung eines geeigneten Organismus mit rekombinant hergestelltem N-terminalen proBNP.
- 15
16. Antikörper nach den Ansprüchen 12 bis 14, erhältlich aus der Zelllinien M 10.1.11 oder M 13.4.14.
- 20
17. Zelllinien M 10.1.11 oder M 13.4.14 hinterlegt am 26.01.1999 bei der DSMZ.
- 25
18. Verfahren zur Herstellung von polyklonalen Antikörpern gemäß den Ansprüchen 12 bis 14 oder 16, enthaltend die Schritte Immunisieren eines geeigneten Organismus mit rekombinant hergestelltem N-terminalem proBNP, Isolieren der Antikörper, Screenen nach den reaktivsten Epitopen und Aufreinigung der Antikörper über Immunsorption an geeigneten Peptiden.
- 30

19. Verfahren zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern gemäß den Ansprüchen 12 bis 16, enthaltend die Schritte Immunisieren eines geeigneten Organismus mit rekombinant hergestelltem N-terminalem proBNP und Auswahl der Klone bezüglich der Reaktivität der Antikörper mit nativem N-terminalem proBNP in verschiedenen 5 Pools von Patientenserien.

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis von N-terminalem proBNP in einer Probe mit mindestens zwei Antikörpern, die verschiedene Epitope des N-terminalen proBNP erkennen. Das Verfahren kann zur Differenzierung bzw. Klassifizierung von Proben von Gesunden und Proben von Patienten der NYHA-Klassen I bis IV angewendet werden. Außerdem betrifft die Erfindung rekombinantes N-terminales proBNP, dessen Verwendung als Standard in einem Verfahren zum Nachweis von N-terminalem proBNP, sowie Antikörper, die rekombinantes N-terminales proBNP erkennen, und deren Herstellung.

5.5.11 CA Inv.

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM

Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICH NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 7 : G01N 33/68	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/45176 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 3. August 2000 (03.08.00) <i>AT. 2000</i>
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/00602		(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, CN, HU, IL, JP, KR, MX, NO, NZ, PL, RU, US, ZA, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
(22) Internationales Anmelddatum: 27. Januar 2000 (27.01.00)		
(30) Prioritätsdaten: 199 03 489.3 29. Januar 1999 (29.01.99) DE 199 11 044.1 12. März 1999 (12.03.99) DE		Veröffentlicht <i>Ohne internationalem Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): ROCHE DIAGNOSTICS GMBH [DE/DE]; D-68298 Mannheim (DE).		
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KARL, Johann [DE/DE]; Bert-Schratzseer-Strasse 7, D-82380 Peissenberg (DE). LILL, Helmut [DE/DE]; Blumenstrasse 15A, D-82407 Wiefenbach (DE). STAHL, Peter [DE/DE]; Hirtenstrasse 12, D-82347 Bernried (DE). KRUEGER, Kerstin [DE/DE]; Waldeslust 4, D-81377 München (DE). BORGYA, Anneliese [DE/DE]; Beiselestrasse 18, D-82327 Tutzing (DE). GALLUSSER, Andreas [CH/DE]; Am Ferchenholz 10, D-82377 Penzberg (DE).		
(74) Gemeinsamer Vertreter: ROCHE DIAGNOSTICS GMBH; Patentabteilung, D-68298 Mannheim (DE).		

(54) Title: METHOD OF IDENTIFYING N-TERMINAL proBNP

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM NACHWEIS VON N-TERMINALEM proBNP

(57) Abstract

The invention relates to a method of identifying N-terminal proBNP in a sample with at least two antibodies that detect different epitopes of the N-terminal proBNP. The method is used to differentiate or classify samples of healthy individuals and samples of patients of NYHA classes I to IV. The invention further relates to recombinant N-terminal proBNP, its use as standard in a method of identifying N-terminal proBNP, to antibodies that detect recombinant N-terminal proBNP and to their production.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis von N-terminalem proBNP in einer Probe mit mindestens zwei Antikörpern, die verschiedene Epitope des N-terminalen proBNP erkennen. Das Verfahren kann zur Differenzierung bzw. Klassifizierung von Proben von Gesunden und Proben von Patienten der NYHA-Klassen I bis IV angewendet werden. Außerdem betrifft die Erfindung rekombinantes N-terminales proBNP, dessen Verwendung als Standard in einem Verfahren zum Nachweis von N-terminalem proBNP, sowie Antikörper, die rekombinantes N-terminales proBNP erkennen, und deren Herstellung.

Verfahren zum Nachweis von N-terminalem proBNP

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis von N-terminalem proBNP in einer Probe mit mindestens zwei Antikörpern, die verschiedene Epitope des N-terminalen proBNP erkennen. Das Verfahren kann zur Differenzierung bzw. Klassifizierung von Proben von Gesunden und Proben von Patienten der NYHA-Klassen I bis IV angewendet werden. Außerdem betrifft die Erfindung rekombinantes N-terminales proBNP, dessen Verwendung als Standard in einem Verfahren zum Nachweis von N-terminalem proBNP, sowie Antikörper, die rekombinantes N-terminales proBNP erkennen, und deren Herstellung.

Herzinsuffizienz ist ein weit verbreitetes Phänomen insbesondere in der westlichen Welt. Unter Herzinsuffizienz versteht man gemäß Roche Lexikon Medizin (1993, Urban & Schwarzenberg) das akute oder chronische Unvermögen des Herzens, bei Belastung oder schon im Ruhezustand den für den Stoffwechsel erforderlichen Blatauswurf aufzubringen bzw. den venosen Rückfluss aufzunehmen (sogenannter Backward- und Forward-Failure). Es liegt also eine Schwäche der Pumpenfunktion vor. Die Ursachen für Herzinsuffizienz sind vielschichtig. Unter anderem sind hier entzündliche und degenerative Veränderungen des Herzmuskels, koronare Durchblutungsstörung, Herzinfarkt und Verletzungen zu nennen. Dies führt zu Veränderungen am peripheren Blutkreislauf, Störung der Atmung, der Nierenfunktion und des Elektrolytstoffwechsels (Ödeme) und zu verminderter Leistungsfähigkeit der Skelettmuskulatur.

Gemäß der New York Heart Association (NYHA) wird Herzinsuffizienz anhand von körperlichen Belastungstests in sogenannte NYHA-Klassen eingeteilt: I bedeutet völlige Beschwerdefreiheit bei normaler körperlicher Belastung, II bedeutet leichte Einschränkung der körperlichen Belastbarkeit, III bedeutet starke Einschränkung der Belastbar-

keit. IV bedeutet, daß bei jeder körperlichen Tätigkeit eine Zunahme der meist auch in Ruhe bestehenden Insuffizienzzeichen stattfindet.

Zu einer effektiven medikamentösen Behandlung von Herzinsuffizienz mittels Glykosiden, Vasodilatoren, ACE-Hemmern und/oder β -Blockern ist es erforderlich, zuvor das Vorliegen einer Herzinsuffizienz genau zu diagnostizieren und möglichst auch nach ihrem Schweregrad zu klassifizieren und zusätzlich den Verlauf der Behandlung zu monitoren.

Im Stand der Technik werden einige Serummarker zur frühen Diagnose von Herzinsuffizienz wie beispielsweise ANP (N-terminal atrial natriuretic peptide hormon) und proANP, CNP (C-natriuretic peptide), Adrenomedullin, Neuropeptid Y, Endothelin und BNP (brain natriuretic peptide) diskutiert. ANP und proANP sind prinzipiell als Marker zur Diagnose von Herzinsuffizienz geeignet, besitzen jedoch eine geringe Stabilität bzw. kurze Halbwertzeit im Blut, was diagnostische Messungen erschwert (Clin. Sci. 95(3) (1998), 235-239; Cleland et al., Heart 75 (1996), 410-413).

Ein häufig zitierter und als aussagekräftig angesehener Marker ist das BNP (brain natriuretic peptide). BNP wurde ursprünglich im Gehirn von Schweinen identifiziert. Es handelt sich dabei um ein Herzhormon, das strukturelle und funktionelle Ähnlichkeit mit ANP (atrial natriuretic peptide) besitzt (Sudoh et al., Nature 332 (1988), 78-81). Das humane BNP, das aus 32 Aminosäuren besteht, wird vor allem von den Herzventrikeln sekretiert und zirkuliert im humanen Blutplasma. Der Einsatz von BNP als diagnostischer Marker ist beispielsweise aus der EP-A-0 542 255 bekannt. BNP besitzt eine intramolekulare Disulfidbrücke und ist als Analyt vermutlich aufgrund seiner physiologischen Funktion als Hormon, das schnell wieder abgebaut werden muß, nicht sehr stabil und daher als diagnostischer Marker nur beschränkt geeignet (Masuta et al., Clin. Chem. Vol. 44 No. 6 Supplement A (1998), 130; Tsuji et al., Clin. Chem. 40 (1994), 672).

Das Vorläufer-Molekül von BNP, das proBNP, besteht aus 108 Aminosäuren, von denen die zuvor beschriebenen 32 C-terminalen Aminosäuren (77-108), die als BNP bezeichnet werden, die eigentliche hormonelle Wirkung entfalten. Die vom Precursor abgespaltenen

N-terminalen Aminosäuren 1-76 werden als N-terminales proBNP bezeichnet. Neben BNP (77-108) zirkuliert auch N-terminales proBNP und weitere Abbauprodukte 1-76 im Plasma (Hunt et al., Biochem. Biophys. Res. Com. 214 (1995), 1175-1183), so daß N-terminales proBNP ebenfalls als Marker für Herzinsuffizienz in Frage kommt. Ob auch das Vorläufer-Molekül proBNP im Plasma vorkommt, ist nicht eindeutig geklärt. Es wird aber beschrieben (Hunt et al., Peptides. Vol. 18, No. 10 (1997), 1475-1481), daß eine geringe Ausschüttung von proBNP (1-108) in Plasma nachweisbar ist, aber aufgrund eines sehr schnellen partiellen Abbaus am N-terminalen Ende einige Aminosäuren fehlen. Dieses Molekül wird in der Literatur als High Molecular Weight-BNP bezeichnet.

In der WO 93/24531 (US 5.786.163) wird ein immunologisches Verfahren zum Nachweis von N-terminalem proBNP und dazu verwendete Antikörper beschrieben. Zur Gewinnung der Antikörper werden hier einzelne synthetisch hergestellte Peptide aus der Sequenz von N-terminalem proBNP verwendet. Prinzipiell ist zwar die Gewinnung von Antikörpern mittels Peptidimmunisierung möglich, doch ist die Affinität zum Gesamtpeptid im allgemeinen zu niedrig, um die erforderliche Sensitivität in einem Testverfahrens zu erreichen. Darüberhinaus besteht die Gefahr, daß bei Verwendung von Peptiden Antikörper gewonnen werden, die beispielsweise den C-Terminus des Peptids erkennen und somit nur dieses Bruchstück des Gesamtpeptids binden können. Daraus folgt, daß diese Antikörper das Gesamtpeptid nicht oder nur schwach binden können. In der WO 93/24531 werden polyklonale Antikörper gegen ein einziges vom N-terminalen proBNP abgeleitetes Peptid hergestellt. Es wird gezeigt, daß die erzeugten Antikörper zwar das Immunisierungspeptid (Aminosäuren 47-64) im kompetitiven Testformat binden. Es wird jedoch nicht gezeigt, daß die Antikörper in der Lage sind, natives N-terminales proBNP als Gesamtpeptid in einer Probe zu binden. Der in der WO 93/24531 beschriebene Sandwichtest in einer Probe kann darüberhinaus nicht wie beschrieben durchgeführt werden, da kein geeignetes Standardmaterial zur Verfügung stand und keine Antikörper gegen zwei verschiedene Epitope vorgelegen haben.

Ein weiteres Problem im Stand der Technik ist die Sensitivität des Tests. Anhand des in der WO 93/24531 durchgeführten kompetitiven Tests, bei dem das Peptid 47-64 in markierter Form als Tracer mit einer Probe bzw. mit dem unmarkierten Peptid-Standard 47-64 um die Bindung an polyklonale Antikörper aus Kaninchenserum kompetieren, wird nach 48-stündiger Inkubation nur eine sehr mäßige Kompetition erreicht, aus der bestenfalls eine untere Nachweisgrenze von etwa 250 fmol/ml abgeleitet werden kann. Dies ist weder für die Differenzierung von Gesunden und Patienten mit einer Herzinsuffizienz, noch für eine differenzierte Klassifizierung von Patientenproben nach Schweregrad der Herzinsuffizienz ausreichend. Außerdem sind die langen Inkubationszeiten des kompetitiven Tests für routinemäßige Messungen der Proben im automatisierten Labor nicht akzeptabel.

Von Hunt et al. (Clinical Endocrinology 47 (1997), 287-296) wird ebenfalls ein kompetitiver Test zum Nachweis von N-terminalem proBNP beschrieben. Hierzu muß die Plasmaprobe vor Vermessung aufwendig extrahiert werden, was die Gefahr birgt, daß der Analyt dabei zerstört wird und Fehlmessungen auftreten. Das hier verwendete Antiserum wird analog zur WO 93/24531 durch Immunisierung mit einem synthetischen Peptid erzeugt. Bei Hunt et al. wird das Antiserum durch Immunisierung mit den N-terminalen proBNP-Aminosäuren 1-13 erzeugt, als Standard wird das Peptid von Aminosäure 1-21 eingesetzt. Auch in diesem Test muß eine lange Inkubationszeit in Kauf genommen werden. Nach 24-stündiger Inkubation wird eine untere Nachweisgrenze von 1,3 fmol/ml erreicht.

Im Stand der Technik existiert somit kein Verfahren zum Nachweis von N-terminalem proBNP, das bei kurzen Inkubationsdauern einen zuverlässigen, sensitiven Nachweis von nativem N-terminalem proBNP ermöglicht.

Aufgabe war es daher, ein Verfahren zum Nachweis von N-terminalem proBNP in einer Probe bereitzustellen, das die aufgeführten Nachteile des Standes der Technik weitestgehend vermeidet. Insbesondere sollte eine hohe Sensitivität im Test erreicht

werden können, damit eine Differenzierung der Patientenproben von Gesunden und Proben von Patienten der NYHA-Klassen I bis IV erfolgen kann.

Die Aufgabe wird gelöst durch das in den Ansprüchen näher definierte Verfahren zum Nachweis von N-terminalem proBNP in einer Probe. Das Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß mindestens zwei Antikörper, die verschiedene Epitope des N-terminalen proBNP erkennen, verwendet werden.

Das wesentliche am erfindungsgemäßen Verfahren ist, daß natives N-terminales proBNP in einer Probe erfasst wird. Das heißt, die Antikörper müssen in der Lage sein, das intakte Molekül und eventuell vorkommendes ungespaltenes proBNP (1-108) und möglichst auch proteolytisch angedaute Bruchstücke in einer Probe zu erkennen und spezifisch zu binden. Im Verfahren werden mindestens zwei verschiedene Antikörper eingesetzt, die verschiedene Epitope des N-terminalen proBNP binden. Die Epitope können linear oder sogenannte Konformationsepitope sein. Bevorzugt sind die Epitope so lokalisiert, daß beide Antikörper gleichzeitig binden können und nicht zu weit voneinander entfernt liegen.

Da die erfindungsgemäße Methode es nicht erlaubt zwischen N-terminalem proBNP, proBNP und nahe verwandten Peptiden (Abbauprodukten) zu differenzieren, wird im folgenden unter NT-proBNP die Gesamtheit aller im Testverfahren erkannter Peptide, insbesondere das bekannte N-terminale proBNP (1-76), verstanden.

Unter dem Begriff "Epitop" wird erfindungsgemäß die Bindungsstelle auf einem immunologischen Bindepartner wie beispielsweise einem Antigen verstanden, an den ein Antikörper spezifisch bindet. Ein "Epitop" wird meist eindeutig durch 6 bis 8 Aminosäuren definiert. Der Bindepartner entspricht erfindungsgemäß dem N-terminalen proBNP beziehungsweise einer Teilsequenz davon. Das Epitop, an den der Antikörper bindet, ist dann ein Teilbereich auf dem Bindepartner. Das Epitop kann in linearer Form oder als Konformationsepitop vorhanden sein.

Mittels der beiden Antikörper unterschiedlicher Spezifität ist es möglich, statt der kompetitiven, langwierigen Testführung des Standes der Technik ein schnelleres Verfahren zum Nachweis des Analyten durchzuführen. Das erfindungsgemäße Nachweisverfahren kann mittels homogener oder heterogener Testführung erfolgen. Bevorzugt ist die heterogene Testführung und besonders bevorzugt das dem Fachmann geläufige Sandwich-Verfahren.

Bevorzugt wird ein solches Verfahren zur Bestimmung des N-terminalen proBNP in folgenden Schritten durchgeführt:

- a) Umsetzen der Probe mit einem für N-terminales proBNP spezifischen ersten Antikörper, der eine mit einer Festphase bindefähige Gruppe trägt, über die die Bindung an eine Festphase erfolgen kann, oder Umsetzen der Probe mit einem für N-terminales proBNP spezifischen ersten Antikörper, der bereits an eine Festphase gebunden ist,
- b) Umsetzen dieser Lösung mit dem zweiten Antikörper, der ein anderes Epitop von NT-proBNP erkennt als der erste Antikörper, und der eine Markierung trägt
- c) Bindung des gebildeten Immunkomplexes an eine Festphase, wobei die Festphase bereits in Schritt a) vorhanden sein kann
- d) Trennung der festen von der flüssigen Phase
- e) Detektion der Markierung in einer oder beiden Phasen.

Bei quantitativer Bestimmung wird die gleiche Messung mit einer definierten Menge an N-terminalem proBNP als Standard durchgeführt und nach Bestimmung der Probe als Schritt f) ein Vergleich der Messwerte des Standards mit dem Wert der Probe und die Quantifizierung durchgeführt.

Unter dem Begriff "Antikörper" werden im Sinne der Erfindung mono- oder polyklonale, chimäre oder humanisierte oder andere durch gentechnologische Modifikationen erhältlichen Antikörper sowie sämtliche dem Fachmann bekannten Fragmente wie $F(ab')_2$, Fab' oder Fab -Fragmente verstanden. Lediglich die immunologische spezifische Bindefähigkeit an N-terminalem proBNP muß gewährleistet sein.

Der erste für N-terminales proBNP spezifische Antikörper kann entweder direkt an die Festphase gebunden sein. oder die Bindung an die Festphase erfolgt indirekt über ein spezifisches Bindungssystem. Die direkte Bindung dieses Antikörpers an die Festphase erfolgt nach dem Fachmann bekannten Methoden. beispielsweise adsorptiv. Wird die Bindung indirekt über ein spezifisches Bindungssystem durchgeführt. so ist der erste Antikörper ein Konjugat, das aus einem Antikörper gegen N-terminales proBNP und einem Reaktionspartner eines spezifischen Bindungssystems besteht. Unter einem spezifischen Bindungssystem werden hier zwei Partner verstanden. die spezifisch miteinander reagieren können. Das Bindungsvermögen kann dabei auf einer immunologischen Reaktion oder auf einer anderen spezifischen Reaktion beruhen. Bevorzugt wird als spezifisches Bindungssystem eine Kombination von Biotin und Avidin oder Biotin und Streptavidin verwendet. Weitere bevorzugte Kombinationen sind Biotin und Antibiotin. Hapten und Anti-Hapten. Fc-Fragment eines Antikörpers und Antikörper gegen dieses Fc-Fragment oder Kohlenhydrat und Lectin. Einer der Reaktionspartner des spezifischen Bindungssystems ist dann Teil des Konjugates.

Der andere Reaktionspartner des spezifischen Bindungssystems für den ersten Bindepartner liegt als Beschichtung der festen Phase vor. Bevorzugt wird hier Streptavidin oder Avidin verwendet. Die Bindung des anderen Reaktionspartners des spezifischen Bindungssystems an ein unlösliches Trägermaterial kann nach den üblichen. dem Fachmann bekannten Methoden vorgenommen werden. Hierbei ist sowohl eine kovalente als auch eine adsorptive Bindung geeignet.

Als Festphase geeignet sind Reagenzgläschchen oder Mikrotiterplatten aus Polystyrol oder ähnlichen Kunststoffen, die an der Innenoberfläche mit einem Reaktionspartner des spezifischen Bindungssystems beschichtet sind. Weiterhin geeignet und besonders bevorzugt sind teilchenförmige Substanzen, wie beispielsweise Latexpartikel, magnetische Partikel, Molekularsiebmaterialien, Glaskörperchen, Kunststoffschläuche und dergleichen. Auch poröse, schichtförmige Träger wie Papier oder Nitrocellulose können als Träger verwendet werden. Besonders bevorzugt werden magnetische Kugelchen, sogenannte Beads verwendet. die wiederum mit dem entsprechenden Bindepartner des

oben beschriebenen spezifischen Bindesystems beschichtet sind. Diese Mikropartikel können dann nach Ablauf der Testreaktion für die Durchführung der Nachweisreaktion beispielsweise durch Filtration, Zentrifugation oder im Falle der magnetischen Partikel durch einen Magneten von der flüssigen Phase getrennt werden.

Der zweite spezifische Antikörper erkennt ein anderes Epitop des N-terminalen proBNP als der erste Antikörper. Der Abstand der beiden Epitope auf dem Molekül muß so groß sein, daß die gleichzeitige Bindung der beiden Antikörper an das N-terminale proBNP ohne Einschränkung möglich ist, da ansonsten kein Sandwich-Komplex gebildet werden kann.

Die Detektion der spezifischen Bindereaktionen zwischen den Antikörpern gegen N-terminales proBNP und N-terminalem proBNP kann auf verschiedene Weise erfolgen. Im allgemeinen ist der zweite Antikörper markiert. Übliche Markierungen sind Chromogene, Fluorophore, zur Chemi- oder Elektrochemilumineszenz fähige Substanzen, Radioisotope, Haptene, Enzymmarkierungen oder Substanzen, die wiederum ein spezifisches Bindungspaar bilden können wie beispielsweise Biotin/Streptavidin. Der Nachweis des Immunkomplexes erfolgt dann anhand des Signals, das von der Markierung ausgesandt wird. Beispielsweise kann der zweite Antikörper mit dem Hapten Digoxigenin markiert sein. Dieses Hapten wird wiederum von einem weiteren, für Digoxigenin spezifischen Antikörper gebunden. Der für Digoxigenin spezifische Antikörper ist selbst beispielsweise mit einem Enzym wie Peroxidase markiert. Der letztendliche Nachweis erfolgt dann anhand der bei der Umsetzung der Peroxidase mit einem entsprechenden Substrat erfolgenden Farb- bzw. Extinktionsänderung.

Als Proben für die Durchführung des Verfahrens zum Nachweis von N-terminalem proBNP können alle dem Fachmann geläufigen biologischen Flüssigkeiten verwendet werden. Bevorzugt werden als Probe Körperflüssigkeiten wie Vollblut, Blutserum, Blutplasma, Urin oder Speichel, besonders bevorzugt wird Blutserum und -plasma eingesetzt.

Neben den sogenannten Naßtesten, bei denen die Testreagenzien in flüssiger Phase vorliegen, können auch alle gängigen Trockentestformate, die zum Nachweis von Antigenen, Haptenen, Peptiden, Proteinen, Antikörpern etc. geeignet sind, verwendet werden. Bei diesen Trockentests oder Teststreifen, wie sie beispielsweise in der EP-A-0 186 799 beschrieben sind, sind im allgemeinen alle Testkomponenten bis auf die zu untersuchende Probe auf einem Träger aufgebracht. Die Nachweisreaktion erfolgt, wenn der Teststreifen mit der flüssigen Probe in Kontakt gebracht wird.

Das erfindungsgemäße Verfahren zeichnet sich dadurch aus, daß die untere Nachweisgrenze für N-terminales proBNP unter 1 fmol/ml liegt (entspricht 1 pmol/l). Die erfindungsgemäß hohe Sensitivität von < 1 fmol/ml wird ohne lange Inkubationszeiten erreicht. Insgesamt liegt die Dauer des Verfahrens bei einem Mikrotiterplattentest unter 2 Stunden, bevorzugt mit sensitiveren Nachweismethoden wie der Electrochemilumineszenz bei 15 Minuten. Eine Obergrenze für das Nachweisverfahren bezüglich der nachzuweisenden Konzentration existiert praktisch nicht. Die technologische Obergrenze wird im allgemeinen durch die verwendete Meßmethode vorgegeben. Das Verfahren weist prinzipiell auch sehr hohe Konzentrationen an N-terminalem proBNP nach.

Ein weiterer Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens ist die gute Differenzierung der Proben von Patienten mit und ohne Herzinsuffizienz anhand der erhaltenen Messwerte. Das Nachweisverfahren ist so sensitiv, daß sogar eine Differenzierung zwischen Patienten ohne koronarer Erkrankung und Patienten mit einer nur schwach ausgeprägten oder langsam einsetzenden Herzinsuffizienz der NYHA-Klassen I und II erfolgen kann. Eine solch frühe Erkennung einer einsetzenden Herzinsuffizienz kann die Entscheidung zu einer frühzeitigen medikamentösen Behandlung beeinflussen und somit die Überlebensrate des Patienten deutlich verlängern.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist rekombinant hergestelltes N-terminales proBNP. Unter N-terminalem proBNP wird der vom 108 Aminosäuren großen Vorläufermolekül proBNP abgespaltene N-terminale Teil verstanden, der aus den

Aminosäuren 1-76 besteht. Unter N-terminalem proBNP werden auch Teile davon verstanden, die aufgrund von Abbaureaktionen dieses Moleküls im Blut vorkommen können

Im Stand der Technik ist bisher kein rekombinantes N-terminales proBNP bekannt, da dessen Herstellung aufgrund der kurzen Aminosäuresequenz nicht leicht möglich ist. Die chemische Synthese eines über 30 Aminosäuren großen Peptids ist aufgrund der auftretenden Fehlsequenzen und der stark abnehmenden Ausbeute pro Syntheszyklus keine Alternative zur rekombinanten Herstellung in einem Wirtsorganismus.

Für ein diagnostisches Nachweisverfahren wird jedoch immer ein Standard- oder Kontrollmaterial benötigt, mit dessen Hilfe zum einen die Bestimmung des Analyten quantitativ erfolgen kann und zum anderen die Funktionsfähigkeit des Tests überprüft werden kann. Soll eine Quantifizierung erfolgen, so muß mittels einer Standardreihe eine definierte quantitative Eichung vorgenommen werden. Eine solche Eichung ist wiederum auch nur dann sinnvoll, wenn das als Standard verwendete Material sich im immunologischen Test gleich oder sehr ähnlich verhält wie der Analyt. Wesentlich dabei ist, daß der Standard eine ausreichend große strukturelle und insbesondere immunologische Ähnlichkeit zum Analyten besitzt, damit die Bindung des Standards an die Nachweisantikörper so erfolgt, wie sie dann auch beim nativen Molekül in der Probe stattfindet.

Ein solches Standardmaterial für ein Verfahren zum Nachweis von N-terminalem proBNP steht im Stand der Technik nicht zur Verfügung. Lediglich kurze synthetische Peptide werden beschrieben. Erfindungsgemäß ist es nun erstmals möglich gewesen, mit Hilfe der Gensynthese eine für N-terminales proBNP codierende DNA-Sequenz herzustellen und anschließend eine rekombinante Expression des N-terminalen proBNP in *E. coli* zu erreichen. Die Vorgehensweise ist in Beispiel 1 erläutert.

Gegenstand der Erfindung ist daher die Verwendung von rekombinantem N-terminalen proBNP als Standard in einem Verfahren zum Nachweis von N-terminalem proBNP in

einer Probe mittels mindestens zweier Antikörper, die verschiedene Epitope des N-terminalen proBNP erkennen.

Für Immunisierungszwecke wurden im Stand der Technik bislang ebenfalls nur synthetische, vom N-terminalen proBNP abgeleitete kurze Peptide eingesetzt. Der Nachteil bei Peptidimmunisierungen ist, daß meist nur sehr niedrig affine Antikörper erhalten werden bzw. die gewonnenen Antikörper nur mit linearen Epitopen reagieren und das nativ gefaltete Antigen in der Probe nicht gebunden werden kann (siehe Beispiel 3).

Deshalb ist es wichtig, für Immunisierungen zur Herstellung von Antikörpern ein Immunogen zu verwenden, das zum letztendlich nachzuweisenden Analyten eine genügend große Ähnlichkeit aufweist. Nur so ist gewährleistet, daß von den Antikörpern der native Analyt in der Probe mit hoher Affinität gebunden wird.

Ein Gegenstand der Erfindung ist daher auch die Verwendung von rekombinantem N-terminalen proBNP als Immunogen zur Herstellung von Antikörpern gegen N-terminales proBNP.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Antikörper gegen rekombinantes N-terminales proBNP. Die Definition des Begriffes Antikörper entspricht der Definition in den Abschnitten über die Testführung. Die erfindungsgemäßen Antikörper erkennen bevorzugt spezifisch Epitope im N-terminalen Teil des 76 Aminosäuren großen N-terminalen proBNP, dabei bevorzugt im Bereich von Aminosäure 10 bis 66, besonders bevorzugt im Bereich von Aminosäure 10 bis 50 oder 10 bis 38. Sinnvoll ist es, wenn die von den Antikörpern erkannten Epitope so lokalisiert sind, daß auch N-terminales proBNP, das in einer Probe bereits von den Enden her proteolytisch angedaut ist, diese Epitope noch enthält. Somit ist die Stabilität des Analyten in der Probe eher zweitrangig. Die Epitope in den bevorzugten Bereichen des N-terminalen proBNP können linear oder als Konformationsepitope vorliegen.

Ein bevorzugter Gegenstand der Erfindung sind daher monoklonale Antikörper, die von den Zelllinien MAK M 10.1.1 und MAK M 13.4.14, hinterlegt und eingegangen am 26.01.1999 bei der DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland, produziert werden. Bei den Antikörpern, die von diesen beiden Zelllinien produziert werden, handelt es sich um Antikörper vom IgG-Typ. Die Zelllinien M 10.1.11 und M 13.4.14 sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung.

Ebenfalls ein Gegenstand der Erfindung sind Antikörper, die in äquivalenter Weise wie die von den Zelllinien M 10.1.11 und M 13.4.14 produzierten mit N-terminalem proBNP spezifisch bindenfähig sind. Unter dem Begriff "in äquivalenter Weise produzierte" Antikörper wird verstanden, daß die Antikörper durch Immunisierung mit rekombinantem N-terminalem pro-BNP gewonnen werden.)

Gegenstand der Erfindung sind auch Verfahren zur Herstellung von Antikörpern, die spezifisch N-terminales proBNP binden.

Die Herstellung von polyklonalen Antikörpern erfolgt bevorzugt mit den Schritten Immunisieren eines geeigneten Organismus wie beispielsweise Schafe mit rekombinant hergestelltem N-terminalem proBNP, Isolieren der Antikörper, Screenen nach den reaktivsten Epitopen und Aufreinigung der Antikörper über Immunsorption an geeigneten Peptiden. Ein solches Verfahren ist in Beispiel 2 beschrieben.

Die Herstellung von monoklonalen Antikörpern erfolgt bevorzugt mit den Schritten Immunisieren eines geeigneten Organismus wie beispielsweise Mäuse mit rekombinant hergestelltem N-terminalem proBNP und Auswahl der Klone bezüglich der Reaktivität der Antikörper mit nativem N-terminalem proBNP in verschiedenen Pools von Patientensternen. Ein solches Verfahren ist in Beispiel 3 beschrieben.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung weiter.

Beispiel 1**Verfahren zur Herstellung von rekombinantem N-terminalen proBNP (1-76)****1. Klonierung des rekombinanten N-terminalen proBNPs**

Die Nukleotidsequenz des N-terminalen ProBNPs (Aminosäuresequenz 1-76) wurde mit Hilfe der Gensynthese hergestellt. Um eine in *E. coli* optimale Expression des Gens zu erreichen, wurde die DNA-Sequenz auf die in *E. coli* am häufigsten verwendeten Codons abgestimmt. Die Sequenzen der Oligonukleotide, die zur Herstellung des Gens verwendet wurden lauten wie folgt:

Pro5' (SEQ ID NO 1).

5'CCGGATCCCACCCGCTG3'

Pro1hum (SEQ ID NO 2):

5'CGGGATCCCACCCGCTGGTTCCCCGGTTCCGCTTCCGACCTGGAAACCT
CCGGTCTGCAGGAACAGCGTAACCACCT3'

Pro2hum (SEQ ID NO 3).

5'CGGTTCCAGGGAGGTCTGTTAACCTGCAGTCGGACAGTTACCCTGCAG
GTGGTTACGCTGTTCTGC3'

Pro3hum (SEQ ID NO 4).

5'CAGACCTCCCTGGAACCGCTGCAGGAATCCCCGCGTCCGACCGGTGTTGG
AAATCCCGTGAAGTTGCTAC 3'

Pro4hum (SEQ ID NO 5):

5'CCCAAGCTTAACGCGGAGCAGCAGGGTGTACAGAACCAACATTACGGTGA
CCACGGATACCTCGGTAGCAACTCACGGGATTCC3'

Pro3' (SEQ ID NO 6):

5'CCCAAGCTTAACGCGGAGC3'

Die Herstellung des Gens erfolgte mit diesen Primern mit Hilfe der PCR (polymerase chain reaction). Das amplifizierte Gen wurde in einen geeigneten Vektor wie z.B. den Vektor pUC19 kloniert und sequenziert. Zur Klonierung des Gens in den Expressionsvektor pQE8 wurde das Gen über die Restriktionsschnittstellen *Bam* HI und *Hind* III aus dem Vektor pUC19 herausgeschnitten, in den Vektor pQE8 ligiert, der eine Expression von Proteinen mit N-terminalem Histidin-Tag erlaubt, und in *E. coli* M15 [pREP4] transformiert.

2. Expression des N-terminalen ProBNPs in *E. coli*

Zur Expression des Gens in *E. coli* wurde eine Übernachtkultur eines rekombinanten *E. coli* Klons 1/60 in Luria-Broth (mit 100 µg/ml Ampicillin und 50 µg/ml Kanamycin) überimpft und bei einer OD 550 von 1 mit IPTG (Isopropylthiogalactosid; 1 mM Endkonzentration) induziert. Nach der Induktion wurden die Kulturen noch weitere 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Kulturen wurden abzentrifugiert und das Zellpellet in 50 mM Na-Phosphatpuffer, pH 8.0; 300 mM NaCl aufgenommen. Nach Aufschluss der Zellsuspension durch Ultraschall, wurde die Suspension abzentrifugiert und der Überstand auf eine Ni-NTA (Nitrilo-triacetat) Säule aufgetragen. Nach einem Waschschritt mit 50 mM Na-Phosphatpuffer, pH 8.0; 300 mM NaCl; 20 mM Imidazol wurde das Histidin-getaggte N-terminale proBNP eluiert mit 50 mM Na-Phosphatpuffer, pH 8.0; 300 mM NaCl; 300 mM Imidazol. Die eluierten Fraktionen wurden vereinigt und gegen 50 mM Tris pH 8.0 dialysiert. Zur Abtrennung von Verunreinigungen wurde das Dialysat auf eine Q-Sepharosesäule aufgetragen. Die Masse des aufgereinigten N-terminalen proBNPs wurde über MALDI-TOF bestimmt.

Beispiel 2**Herstellung von polyklonalen Antikörpern gegen N-terminales pro-BNP****1. Immunisierung**

Schafe wurden mit rekombinantem N-terminalem proBNP(1-76) in kompletten Freund'schem Adjuvans immunisiert. Die Dosis betrug 0,1 mg je Tier. Die Immunisierungen wurden über 10 Monate im Abstand von 4 Wochen wiederholt. 6 Wochen nach der ersten Immunisierung und danach monatlich einmal wurden Serumproben gewonnen und auf Sensitivität und Titer untersucht.

2. Aufreinigung von polyklonalen Antikörpern aus Schafserum

Aus dem Rohserum eines mit rekombinantem N-terminalem proBNP immunisierten Schafs wurden Lipidbestandteile durch Delipidierung mit Aerosil (1,5%) entfernt. Danach wurden die Immunglobuline mit Ammoniumsulfat (2M) ausgefällt. Der gelöste Niederschlag wurde gegen 15mM KPO₄, 50mM NaCl pH 7.0 dialysiert und über DEAE-Sepharose chromatographiert. Die IgG-Fraktion, PAK<rec. NT-pro-BNP>S-IgG(DE), befand sich im Durchlauf.

3. Sequenzielle Affinitätschromatographie zur Herstellung von NT-pro-BNP spezifischen polyklonalen Antikörpern

Für die Aufreinigung von NT-proBNP spezifischen, gegen die Aminosäuren 1-21 gerichteten polyklonalen Antikörpern, PAK<rec. NT-pro-BNP>M-IgG(IS,1-21), wurde das C-terminal biotinylierte Peptid HPLGSPGSASDLETSGLQEQR-Bi (1-21-Bi, SEQ ID NO 7) verwendet. Die Affinitätsmatrix wurde durch Beladen von 10ml Streptavidin beschichteten Methacrylatpolymer-Partikeln (Boehringer Mannheim, Best. Nr. 1529188) mit 1mg Peptid (1-21-Bi) hergestellt.

Mit 10ml der Affinitätsmatrix wurde eine Säule gepackt und mit 50mM KPO₄, 150mM NaCl pH 7.5 (PBS) äquilibriert. Für den ersten Schritt der sequenziellen Affinitätschromatographie wurden 850mg PAK<NT-pro-BNP>S-IgG(DE) auf die Säule aufgezogen. Der Durchlauf wurde für einen zweiten Schritt (siehe unten) aufgehoben. Die Säule wurde mit PBS und 20mM KPO₄, 500mM NaCl, 0,1% Triton X-100, 0,5% Na-Deoxicholsäure pH 7.5 gewaschen. Das spezifisch an die Affinitätsmatrix gebundene IgG wurde mit ImmunoPure[®] Gentle Ag/Ab Elution Buffer (Pierce, Product #: 21013) eluiert. Die Affinitätsmatrix wurde mit 1M Propionsäure regeneriert und in PBS/NaN₃ gelagert.

Auf die gleiche Art und Weise wie oben beschrieben, wurde das Peptid Bi-ELQVEQTSL (Bi-30-38 SEQ ID NO 8) für die Herstellung einer Affinitätsmatrix zur Aufreinigung von NT-pro-BNP spezifischen, gegen die Aminosäuren 30-38 gerichteten Immunoglobulinen verwendet. PAK<rec. NT-pro-BNP>M-IgG(IS.30-38) wurde aus dem Durchlauf der ersten Affinitätsreinigung gewonnen.

4. Biotinylierung von PAK<NT-pro-BNP>S-IgG(IS.1-21)

Die affinitätsgereinigten Antikörper werden gegen den Biotinylierungspuffer (100mM KPO₄, 70mM NaCl pH 8.0) dialysiert und anschließend wird die Lösung auf eine Proteinkonzentration von 1mg/ml eingestellt. D-Biotinoyl-Aminocapronsäure-N-Hydroxysuccinimidester wird in DMSO gelöst und in einem molaren Verhältnis von 1:7.5 der Antikörperlösung beigemischt. Die Reaktion wird durch Zugabe von L-Lysin gestoppt und das überschüssige Markierungsreagenz wird durch Dialyse entfernt.

5. Digoxigenylierung von PAK<NT-pro-BNP>S-IgG(IS.30-38)

Die affinitätsgereinigten Antikörper werden gegen den Digoxigenylierungspuffer (100mM KPO₄, 70mM NaCl pH 7.6) dialysiert und anschließend wird die Lösung auf eine Proteinkonzentration von 1mg/ml eingestellt. Digoxigenin-3-CME-N-Hydroxysuccinimidester wird in DMSO gelöst und in einem molaren Verhältnis von 1:5 der

Antikörperösung beigemischt. Die Reaktion wird durch Zugabe von L-Lysin gestoppt und das überschüssige Markierungsreagenz wird durch Dialyse entfernt.

Beispiel 3

Herstellung und Screening nach monoklonalen Antikörpern gegen N-terminales proBNP (1-76)

1. Gewinnung von monoklonalen Antikörpern gegen NT-pro-BNP(1-76)

Balb/c-Mäuse, 8-12 Wochen alt, werden mit 100 µg rekombinantem N-terminalem proBNP-Antigen, mit komplettem Freudschen Adjuvans, intraperitoneal immunisiert. Nach 6 Wochen werden drei weitere Immunisierungen in 4 wöchigem Abstand durchgeführt. Eine Woche nach der letzten Immunisierung erfolgt eine Blutabnahme und die Bestimmung des Antikörpertiters im Serum der Versuchstiere. Aus positiv reagierenden Mäusen werden aus der Milz dieser Tiere die B-Lymphozyten gewonnen, die mit einer permanenten Myelomzelllinie fusioniert werden. Die Fusionierung erfolgt nach dem bekannten Verfahren von Köhler und Millstein (Nature 256, 1975, S. 495 – 497). Die hierbei gebildeten Primärkulturen von Hybridzellen werden in üblicher Weise, z.B. unter Verwendung eines handelsüblichen Zellsorters oder durch "limiting dilution" kloniert. Es werden nur die Klonkulturen weiterverarbeitet, die in einem geeigneten Testverfahren, beispielsweise einem Enzym-Immuno-Assay (ELISA-Verfahren), positiv mit rekombinantem N-terminalem proBNP reagieren und natürliches N-terminales proBNP in Patientenserien erkennen (siehe Punkt 2.). Man erhält so mehrere Hybridoma-Zelllinien, die die erfundungsgemäßen monoklonalen Antikörper produzieren.

Zur Erzeugung von Aszites werden 5×10^6 Hybridomzellen intraperitoneal in Balb/c Mäuse gespritzt, die zuvor 1-2 mal mit 0,5 ml Pristan vorbehandelt worden sind. Nach 2-3 Wochen kann aus dem Bauchraum der Mäuse Aszites-Flüssigkeit gewonnen werden. Hieraus können in üblicher Weise die Antikörper isoliert werden. Diese monoklonalen Antikörper sind spezifisch gegen humanes N-terminales proBNP gerichtet. Sie werden

im folgenden MAK M 10.1.11 bzw. MAK M 13.4.14 bezeichnet. Die beiden monoklonalen Antikörper gehören der Subklasse IgG1, kappa an.

Auf diese Weise konnten die beiden Hybridoma-Zelllinien Klon M 10.1.11 und M 13.4.14 isoliert werden, die bei der DSMZ, wie oben erwähnt, hinterlegt wurden.

2. Screening-Test auf Antikörper gegen pro-BNP-Peptide und rekombinantes NT-pro-BNP

Um die Anwesenheit und Spezifität von Antikörpern gegen NT-proBNP im Serum immunisierter Mäuse, im Kulturüberstand der Hybridzellen oder in Aszitesflüssigkeit zu erkennen, wurden die Klone mit folgenden Testprinzipien bewertet:

a) Reaktivität mit rekombinantem N-terminalem proBNP

Mikrotiterplatten (Fa. Nunc, Maxisorb) werden mit 2,5 µg/ml rekombinantem NT-proBNP als Antigen in Beladungspuffer (Fa. Boehringer, 0,2 M Natriumcarbonat-/Bicarbonat, pH 9,3-9,5, Cat. No. 726 559) 100 µl/well, 1 Stunde bei Raumtemperatur unter Schütteln, gebunden. Die Nachbeladung erfolgt in PBS-Puffer (Phosphate Buffered Saline, Fa. Oxid, Code-BR 14a) und 1% Byco C, 30 Minuten. Anschließend wird mit Waschpuffer gewaschen (0,9 Natriumchlorid-Lösung, 0,05% Tween 20). Die Antikörperprobeninkubation erfolgt mit 100 µl/well, 1 Stunde bei Raumtemperatur unter Schütteln. Dann wird erneut zweimal mit Waschlösung gewaschen. Dann erfolgt eine weitere Inkubation mit dem Nachweisantikörper PAK<M-Fc>S-Fab-Peroxidasekonjugates (Boehringer Mannheim, Kat. Nr. 1500 686), 100 mU/ml, 100 µl/well, 1 Stunde bei Raumtemperatur unter Schütteln. Nach einem erneuten Waschschritt mit Waschpuffer wird die Peroxidaseaktivität in üblicher Weise bestimmt (beispielsweise mit ABTS®, 30 Minuten bei Raumtemperatur, abgelesen wird die Extinktionsdifferenz in mE, bei 405 nm mittels eines ELISA-Readers).

b) Reaktivität mit N-terminalen proBNP-Peptiden:

In diesem Fall werden Streptavidin-beladene Mikrotiterplatten mit NT-pro-BNP-Peptid-Biotinkonjugaten der Sequenzen 1-10, 8-18, 1-21, 16-30, 30-38, 39-50, 50-63 oder 64-76 als Antigen, 250 ng/ml in PBS-Puffer (Phosphate Buffered Saline. Fa. Oxid. Code-BR 14a) mit 0,5 % Byco C, 100 µl/well, 1 Stunde bei Raumtemperatur unter Schütteln, gebunden. Anschließend wird mit Waschpuffer gewaschen (0,9 Natriumchlorid-Lösung, 0,05% Tween 20). Die Antikörperprobeninkubation und die Nachweisreaktion erfolgt wie unter a) beschrieben. Aufgrund der Reaktivität mit bestimmten NT-pro-BNP-Peptiden kann die Lage des Epitops erfaßt werden.

c) Reaktivität mit nativem N-terminalem proBNP in der Patientenprobe

Mikrotiterplatten (Fa. Nunc, Maxisorb) werden mit 5 µg/ml PAK<human pro-BNP>S-IgG (IS,(1-21) bzw. (30-38)S-IgG in Beschichtungspuffer (Fa. Boehringer, 0,2 M Natriumcarbonat/-Bicarbonat, pH 9,3 -9,5, Cat. No. 728 559) 100 µl/well, 1 Stunde bei Raumtemperatur unter Schütteln, gebunden. Die Nachbeladung erfolgt in PBS-Puffer (Phosphate Buffered Saline. Fa. Oxid. Code-BR 14a) und 1% Byco C, 30 Minuten. Anschließend wird mit Waschpuffer gewaschen (0,9 Natriumchlorid-Lösung, 0,05% Tween 20). Die Inkubation mit nativem Antigen in Patientenplasma, verdünnt in PBS-Puffer, erfolgt mit 100 µl/well, 1 Stunde bei Raumtemperatur unter Schütteln. Nach einem erneuten Waschschnitt erfolgt die Antikörper-probeninkubation mit 100 µl/well, 1 Stunde bei Raumtemperatur unter Schütteln. Dann wird erneut zweimal mit Waschlösung gewaschen und es erfolgt eine weitere Inkubation mit dem Nachweisantikörper PAK<M-Fcy>S-Fab-Peroxidase-konjugates (Boehringer Mannheim GmbH, Kat. Nr. 1500 686), 100 mU/ml, 100 µl/well, 1 Stunde bei Raumtemperatur unter Schütteln. Nach einem erneuten Waschschnitt mit Waschpuffer wird die Peroxidaseaktivität in üblicher Weise bestimmt (beispielsweise mit ABTS[®], 30 Minuten bei Raumtemperatur, abgelesen wird die Extinktionsdifferenz in mE, bei 405 nm mittels eines ELISA-Readers).

3. Ergebnisse: Reaktionsmuster der monoklonalen und polyklonalen Antikörper gegen N-terminales proBNP

a) Reaktivität der MAKs ($c = 5 \mu\text{g/ml}$) aus Immunisierung mit N-terminalen proBNP-Peptiden:

Tabelle 1:

MAK	Immu-nogen	Reaktivität mit Pro-BNP-Peptiden								Rec. pro-BNP	Natives pro-BNP
		1-10	8-18	11-21	16-30	30-38	39-50	50-63	64-76		
5.2.27	1-10	1.42	0.04	1.48	0.05	0.03	0.04	0.04	0.04	1.16	0.30
2.1.4	16-30	0.04	0.04	0.04	1.86	0.04	0.04	0.04	0.04	0.1	0.02
1.2.6	39-50	0.04	0.04	0.03	0.04	0.03	1.23	0.03	0.04	0.44	0.06

Die monoklonalen Antikörper, die aus Immunisierungen mit unterschiedlichen Peptiden erhalten wurden, reagieren sehr stark mit den jeweiligen Peptiden. Die Reaktivität mit dem rekombinanten N-terminalen proBNP ist nur bei 2 monoklonalen Antikörpern zu erkennen, während mit nativem N-terminalen proBNP in einem Patientenpool keine Reaktion erfolgt (siehe Tabelle 1).

b) Reaktivität der monoklonalen Antikörper (MAK) aus Immunisierung mit rekombinantem N-terminalen proBNP:

Tabelle 2:

MAK	Reaktivität mit Pro-BNP-Peptiden								Rec. pro-BNP	Natives proBNP
	1-10	8-18	11-21	16-30	30-38	39-50	50-63	64-76		
10.1.11	0.04	0.97	1.03	0.04	0.04	0.06	0.04	0.04	1.61	1.70
10.3.19	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.05	0.04	0.03	1.24	0.91
10.3.30	0.04	0.04	0.03	0.04	0.04	0.06	0.04	0.03	1.43	0.79
13.4.14	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.05	0.03	0.04	1.65	1.83
13.1.18	0.04	0.04	0.03	0.04	1.14	0.03	0.04	0.04	1.47	0.56
13.2.22	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.03	0.04	0.04	1.82	1.61

Die monoklonalen Antikörper aus der Immunisierung mit rekombinantem N-terminalen proBNP reagieren nur vereinzelt mit Peptiden, aber sehr stark mit rekombinantem N-terminalen proBNP bzw. mit nativem N-terminalen proBNP in einem Patientenpool. Die Nichtreaktion einzelner monoklonaler Antikörper mit den Peptiden deutet auf die Erkennung sogenannter Konformationsepitope hin (siehe Tabelle 2).

c) Reaktivität der PAKs aus Immunisierung mit rekombinantem N-terminalem proBNP:

Tabelle 3:

PAK	Immun-sorption	Reaktivität mit Pro-BNP-Peptiden								Rec. pro-BNP	Natives pro-BNP
		1-10	8-18	1-21	16-30	30-38	39-50	50-63	64-76		
S-9212	ohne	0.13	1.81	1.98	1.16	2.99	0.83	1.22	0.06	0.89	-
S-9212	1-21	0.99	2.99	2.99	1.00	0.20	0.13	0.20	0.15	1.98	1.41
S-9212	30-38	0.08	0.07	0.07	0.07	2.99	0.06	0.17	0.06	2.99	1.41

Der gewonnene PAK reagierte am stärksten mit den Peptiden 1-21 und 30-38. Aus diesem Grund wurden diese Epitope ausgewählt und der PAK mit Hilfe dieser Peptide positiv immunsorbiert. Der mit Peptid 1-21 immunsorbierte PAK reagiert am stärksten mit der Region 8-20 und deutlich abgeschwächt mit der N-terminalen Sequenz 1-10. Die so immunsorbierten PAKs reagieren sehr stark mit dem rekombinanten N-terminalen proBNP und im PAK/PAK-Sandwichformat mit der nativen Probe (siehe Tabelle 3).

Beispiel 4

Hochsensitiver Immunoassay zur Bestimmung von NT-pro-BNP

Mit Hilfe der in Beispiel 2 und 3 gewonnenen Antikörper konnte ein hochsensitiver Immunoassay aufgebaut werden. Generell sind alle Testformate geeignet, bei denen 2 Antikörper mit unterschiedlicher Epitoperkennung eingesetzt werden. Als Beispiel wird ein sogenannter Sandwich-ELISA beschrieben.

Als Festphase wurde eine mit Streptavidin beschichtete Mikrotiterplatte (MTP) verwendet. 10 µl unbehandelte Probe oder Kalibrator wird zusammen mit 100 µl Puffer, der die beiden epitop-spezifischen Antikörper enthält, in die MTP-Näpfe pipettiert und 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Als Antikörper wurden 1 µg/ml biotinylierter PAK<rec. NT-pro-BNP>S-IgG(IS, 1-21) und 0.5 µg/ml digoxigenylierter PAK<rec. NT-pro-BNP>S-IgG(IS, 30-38) eingesetzt. Anschließend wird die Lösung abgesaugt und 3x mit 350 µl Waschpuffer gewaschen. Danach werden 100 µl Konjugatösung

dazupipettiert und wiederum 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Als Konjugat wird ein Anti-Digoxin-Antikörper-POD-Konjugat in einer Konzentration von 100 mIU/ml verwendet. Anschließend wird die Konjugatlösung abgesaugt und 3x mit 350 µl Waschpuffer gewaschen. Zum Schluß wird ABTS*-Substratlösung in die Wells pipettiert und 30 Minuten bei Raumtemperatur gemessen. Nach Erreichen der 30-minütigen Substratreaktion wird die Mikrotiterplatte sofort in einem MTP-Reader bei einer Wellenlänge von 405 nm gegen die Referenzwellenlänge von 495 nm vermessen.

Zur Bestimmung der Sensitivität wurde eine Eichkurve erstellt und die Präzision des Nullstandards ($n = 21$) bestimmt. Als Kalibratoren wurde humanes EDTA-Plasma verwendet, welches mit rekombinantem N-terminalen proBNP in der erforderlichen Konzentration aufgestockt wurde. Als Nullstandard wurde Rinderplasma verwendet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4:

	Extinktion (Mittelwert)	Standardabweichung ($n = 21$)
Kalibrator a: 0 fmol/ml	131 mE	5.7 mE
Kalibrator b: 5.04 fmol/ml	268 mE	
Kalibrator c: 19.9 fmol/ml	746 mE	
Kalibrator d: 50.5 fmol/ml	1500 mE	
Kalibrator e: 100.9 fmol/ml	2401 mE	

Anhand der Eichkurvensteilheit von $22.5 \text{ mE} \times \text{ml/fmol}$ und einem SD von 5.7 mE ergibt sich nach der Formel von Kaiser folgende untere Nachweisgrenze:

$$\text{UNG} = 3 \text{ SD}_{\text{Nullstandard}} / \text{Ek-steilheit} = 3 \times 5.7 / 22.5 = 0.76 \text{ fmol/ml.}$$

Beispiel 5**Ermittlung der Probenstabilität von N-terminalem proBNP**

Mit Hilfe des in Beispiel 4 beschriebenen Sandwich-ELISA wurde die Analytstabilität von N-terminalem proBNP vermessen. Dazu wurden 4 Patienten mit NYHA-Klasse II-III Blut in EDTA-haltigen Abnahmeröhrchen abgenommen und bei Raumtemperatur über 3 Tage aufbewahrt. Jeden Tag wurde eine Probe entnommen und der Gehalt an N-terminalem proBNP vermessen. Die Referenzprobe sowie die Proben zur Stabilitäts-ermittlung in EDTA-Plasma wurden sofort auf 4°C - 8°C abgekühlt und innerhalb von 15 Minuten zentrifugiert. Die EDTA-Plasmen wurden bei 4°C und Raumtemperatur aufbewahrt und zu verschiedenen Zeitpunkten innerhalb einer 24-stündigen Belastungszeit vermessen. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5:

Belastungszeit	Wiederfindung (%)
EDTA-Vollblut, Raumtemperatur	98.8
	98.0
	100.5
EDTA-Plasma, 4°C	97.5
	98.5
	102.0
	103.0
EDTA-Plasma, Raumtemperatur	103.0
	104.8
	102.0
	96.0

→ Patienten

Tabelle 5

Tabelle 5

Diese Daten belegen, daß N-terminales proBNP innerhalb der geprüften Zeitpunkte vollkommen stabil ist und somit als Routineparameter verwendbar ist. Dieses Ergebnis ist widersprüchlich zur Literatur (Hunt et. al., Clinical Endocrinology, 47, 287 (1997)) und bestätigt die Annahme, daß durch Auswahl und Design dieses Testformats mit 2 spezifischen Antikörpern, deren Epitope nicht am äußeren Ende des Analyten liegen, die Analytstabilität beeinflußt werden kann.

Beispiel 6**Ermittlung der diagnostischen Sensitivität des N-terminalen proBNP-Assays**

Zur Ermittlung der diagnostischen Sensitivität wurde wiederum der in Beispiel 4 beschriebene Test verwendet. Dazu wurden 114 Gesunde und 235 Patienten mit einer NYHA-Klassifizierung zwischen I und IV vermessen. Normalerweise ist es besonders kritisch, Gesunde von Patienten mit NYHA-Klasse I zu unterscheiden.

Mit diesem hochsensitiven Assay wurde bei den 110 gesunden Blutspendern ein Medianwert von 6,6 fmol/ml NT-proBNP mit einer Standardabweichung von 7,3 fmol/ml ermittelt. Der niedrigste Wert wurde mit 0,2 fmol/ml ermittelt. Dies zeigt deutlich, daß eine Sensitivität $< 1,0$ fmol/ml notwendig ist, um den Referenzbereich genau zu erfassen. Mit Hilfe dieser Verteilung wurde der obere Normalwertbereich (97,5% Percentile) mit 26,6 fmol/ml ermittelt.

Unter Annahme des Referenzwertbereichs von 0 - 26,6 fmol/ml wurden von den 233 Patienten mit NYHA-Klassifizierung I-IV nur 16 Patienten mit einem Wert im Normalbereich ermittelt. Dies entspricht einer klinischen Sensitivität von 93,3%. Werden nur die Patienten mit einer NYHA-Klassifizierung von I betrachtet, dann werden 30 der 37 Patienten positiv erkannt, dies entspricht einer Sensitivität von 81,1 %.

Dieses Ergebnis bestätigt, daß durch diesen hochsensitiven N-terminalen proBNP-Assay eine deutliche Differenzierung zwischen Patienten mit einer Herzinsuffizienz der NYHA-Klasse I von gesundem Normalkollektiv unterscheidbar ist. Dies konnte mit den bisher im Stand der Technik verfügbaren Assays (Dagubatti et al., *Cardiovascular Research* 36 (1997), 246 nicht erreicht werden.

BUDAPESTER VERTRAG UBER DIE INTERNATIONALE
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN
FUR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

INTERNATIONALES FORMBLATT

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Str. 116
68305 Mannheim

EMPFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG.
ausgestellt gemäß Regel 7.1 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

<p>I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS</p> <p>Vom HINTERLEGER zugewiesenes Bezeichnungszeichen: MAK<proBNP>M 10.1.11</p> <p>Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM ACC2386</p>	
<p>II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG</p> <p>Mit dem unter I. bezeichneten Mikroorganismus wurde</p> <p>(<input type="checkbox"/>) eine wissenschaftliche Beschreibung (<input type="checkbox"/>) eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung</p> <p>eingereicht. (Zu reitendes ankreuzen).</p>	
<p>III. EINGANG UND ANNAHME</p> <p>Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I. bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am 1999-01-25 (Datum der Ersthinterlegung) eingegangen ist.</p>	
<p>IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG</p> <p>Der unter I. bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser Internationalen Hinterlegungsstelle am eingegangen (Datum der Ersthinterlegung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Ersthinterlegung in eine Hinterlegung gemäß Budapestter Vertrag ist am eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung).</p>	
<p>V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE</p> <p>Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH</p> <p>Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig</p> <p>Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:</p> <p><i>U. Weils</i></p> <p>Datum: 1999-02-11</p>	

¹ Falls Regel 6.4 Buchstabe d zutrifft, ist dies der Zeitpunkt, zu dem der Status einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben worden ist.

BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

INTERNATIONALES FORMBLATT

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Str. 116

68305 Mannheim

LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG
ausgestellt gemäß Regel 10.2 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. HINTERLEGER	II. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS
Name: Roche Diagnostics GmbH Sandhofer Str. 116 Anschrift: 68305 Mannheim	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM ACC2386 Datum der Hinterlegung oder Weiterleitung: 1999-01-26
III. LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG	
<p>Die Lebensfähigkeit des unter II genannten Mikroorganismus ist am 1999-01-27 geprüft worden. Zu diesem Zeitpunkt war der Mikroorganismus</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> lebensfähig <input type="checkbox"/> nicht mehr lebensfähig</p>	
IV. BEDINGUNGEN, UNTER DENEN DIE LEBENSFÄHIGKEITSPRUFUNG DURCHGEFÜHRT WORDEN IST	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:  Datum: 1999-02-11

Angabe des Datums der Ersthinterlegung. Wenn eine erneute Hinterlegung oder eine Weiterleitung vorgenommen worden ist, Angabe des Datums der jeweils letzten erneuten Hinterlegung oder Weiterleitung.
In den in Regel 10.2 Buchstabe a Ziffer ii und iii vorgesehenen Fällen Angabe der letzten Lebensfähigkeitsprüfung.
Zureitendes ankreuzen.
Ausfüllen, wenn die Angaben beantragt worden sind und wenn die Ergebnisse der Prüfung negativ waren.

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
3. August 2000 (03.08.2000)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 00/45176 A3

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: G01N 33/68,
C07K 14/58, 16/26, 16/18, C12N 15/06

Hirtenstrasse 12, D-82347 Bernried (DE). KRUEGER,
Kerstin [DE/DE]; Waldeslust 4, D-81377 München
(DE). BORGYA, Anneliese [DE/DE]; Beiselestrasse
18, D-82327 Tutzing (DE). GALLUSSER, Andreas
[CH/DE]; Am Ferchenholz 10, D-82377 Penzberg (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/00602

(74) Gemeinsamer Vertreter: ROCHE DIAGNOSTICS
GMBH; Patentabteilung, D-68298 Mannheim (DE).

(22) Internationales Anmeldedatum:

27. Januar 2000 (27.01.2000)

(74) Gemeinsamer Vertreter: ROCHE DIAGNOSTICS
GMBH; Patentabteilung, D-68298 Mannheim (DE).

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(81) Bestimmungsstaaten (national): AU, CA, CN, HU, IL, JP,
KR, MX, NO, NZ, PL, RU, US, ZA.

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT,
BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,
NL, PT, SE).

(30) Angaben zur Priorität:

199 03 489.3 29. Januar 1999 (29.01.1999) DE
199 11 044.1 12. März 1999 (12.03.1999) DE

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): ROCHE DIAGNOSTICS GMBH [DE/DE];
D-68298 Mannheim (DE).

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen
Recherchenberichts: 26. Juli 2001

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KARL, Johann
[DE/DE]; Bert-Schratzlseer-Strasse 7, D-82380 Pei-
senberg (DE). LILL, Helmut [DE/DE]; Blumenstrasse
15A, D-82407 Wielenbach (DE). STAHL, Peter [DE/DE];

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD OF IDENTIFYING N-TERMINAL proBNP

A3

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM NACHWEIS VON N-TERMINALEM proBNP

WO 00/45176

(57) Abstract: The invention relates to a method of identifying N-terminal proBNP in a sample with at least two antibodies that detect different epitopes of the N-terminal proBNP. The method is used to differentiate or classify samples of healthy individuals and samples of patients of NYHA classes I to IV. The invention further relates to recombinant N-terminal proBNP, its use as standard in a method of identifying N-terminal proBNP, to antibodies that detect recombinant N-terminal proBNP and to their production.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis von N-terminalem proBNP in einer Probe mit mindestens zwei Antikörpern, die verschiedene Epitope des N-terminalen proBNP erkennen. Das Verfahren kann zur Differenzierung bzw. Klassifizierung von Proben von Gesunden und Proben von Patienten der NYHA-Klassen I bis IV angewendet werden. Außerdem betrifft die Erfindung rekombinantes N-terminales proBNP, dessen Verwendung als Standard in einem Verfahren zum Nachweis von N-terminalem proBNP, sowie Antikörper, die rekombinantes N-terminales proBNP erkennen, und deren Herstellung.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/00602

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 7 G01N33/68 C07K14/58 C07K16/26 C07K16/18 C12N15/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

WPI Data, PAJ, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 93 24531 A (DZIEGLEWSKA HANNA EVA ; MEDINNOVA SF (NO); HALL CHRISTIAN (NO)) 9 December 1993 (1993-12-09) cited in the application claims 1,9	1-4, 9-14,18
Y	HUNT P J ET AL: "IMMUNOREACTIVE AMINO-TERMINAL PRO-BRAIN NATRIURETIC PEPTIDE (NT-PROMBNP): A NEW MARKER OF CARDIAC IMPAIRMENT" CLINICAL ENDOCRINOLOGY, GB, BLACKWELL SCIENTIFIC PUBLICATIONS, OXFORD, vol. 47, 1997, pages 287-296, XP000913471 ISSN: 0300-0664 page 287, column 2, line 15 - line 20	1,5-8
X		1,5-8
X		9-14,18
		-/-

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

10 August 2000

21/08/2000

Name and mailing address of the ISA
 European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Gundlach, B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/00602

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9324531	A 09-12-1993	AT 172989	T	15-11-1998
		AU 667223	B	14-03-1996
		AU 4340593	A	30-12-1993
		CA 2136961	A	09-12-1993
		DE 69321955	D	10-12-1998
		DE 69321955	T	10-06-1999
		EP 0648228	A	19-04-1995
		ES 2123056	T	01-01-1999
		JP 7507210	T	10-08-1995
		US 5786163	A	28-07-1998

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/00602

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 IPK 7 G01N33/68 C07K14/58 C07K16/26 C07K16/18 C12N15/06

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

WPI Data, PAJ, BIOSIS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 93 24531 A (DZIEGLEWSKA HANNA EVA ; MEDINNOVA SF (NO); HALL CHRISTIAN (NO)) 9. Dezember 1993 (1993-12-09) in der Anmeldung erwähnt Ansprüche 1,9	1-4, 9-14,18
Y	HUNT P J ET AL: "IMMUNOREACTIVE AMINO-TERMINAL PRO-BRAIN NATRIURETIC PEPTIDE (NT-PROBNP): A NEW MARKER OF CARDIAC IMPAIRMENT" CLINICAL ENDOCRINOLOGY, GB, BLACKWELL SCIENTIFIC PUBLICATIONS, OXFORD, Bd. 47, 1997, Seiten 287-296, XP000913471 ISSN: 0300-0664	1,5-8
X	Seite 287, Spalte 2, Zeile 15 - Zeile 20	1,5-8
		9-14,18
		-/-

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem Internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgestrahlt)
- "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- "P" Veröffentlichung, die vor dem Internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

- "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem Internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

10. August 2000

21/08/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patenttaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Gundlach, B

INTERNATIONA

RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/00602

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9324531	A	09-12-1993	AT 172989 T	15-11-1998
			AU 667223 B	14-03-1996
			AU 4340593 A	30-12-1993
			CA 2136961 A	09-12-1993
			DE 69321955 D	10-12-1998
			DE 69321955 T	10-06-1999
			EP 0648228 A	19-04-1995
			ES 2123056 T	01-01-1999
			JP 7507210 T	10-08-1995
			US 5786163 A	28-07-1998